



# Brevet d'invention

**Certificat d'utilité**

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 NOV. 2010

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
La Directrice des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • W / 210502

REMISE DES BREVETS  
DATE **13 JAN 2004**

LIEU **75 INPI PARIS 34 SP**  
**0400260**

N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI **13 JAN. 2004**

Vos références pour ce dossier  
(facultatif) **MJPbv539/120**

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET ORES**  
**36, rue de Saint-Pétersbourg**  
**75008 PARIS**

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

**Cochez l'une des 4 cases suivantes**

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*  
*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

N°

Date

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

**SOUCHES VACCINALES D'APICOMPLEXES DE LA FAMILLE DES SARCOCYSTIDAE.**

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**

**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

**5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom  
ou dénomination sociale

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**

Prénoms

Forme juridique

**Etablissement public**

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

**147, rue de l'Université**

Code postal et ville

**75 007 PARIS**

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE EN DÉPÔT **13 JAN 2004** Réserve à l'INPI  
DATE  
LIEU **75 INPI PARIS 34 SP**  
**0400260**  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

08 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		VIALLE-PRESLES
Prénom		Marie José
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de Saint-Petersbourg
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00
N° de télécopie (facultatif)		01.53.2108.88
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  M. MARTIN

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...

**BR/suite**

REMISE DES PIÈCES  
DATE **13 JAN 2004**  
LIEU **75 INPI PARIS 34 SP**  
N° D'ENREGISTREMENT **0400260**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 829 © W / 010702

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		MJPbv539/120	
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75 011 PARIS	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, rue des Tanneurs	
	Code postal et ville	37 041 TOURS CEDEX 1	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>1 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  <b>M. MARTIN</b>	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		MJPbv539/120
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>		
SOUCHES VACCINALES D'APICOMPLEXES DE LA FAMILLE DES SARCOCYSTIDAE		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - 75007 PARIS,		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3 rue Michel Ange - 75016 PARIS,		
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS - 3 rue des Tanneurs - 37041 TOURS CEDEX 1		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	<b>Nom</b>	DUBREMETZ
	<b>Prénoms</b>	Jean-François
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	700 avenue Paul Parguel
	<b>Code postal et ville</b>	Résidence le Vivaldi, Appt 85, Bâtiment C1, 3 4 0 9 0   MONTPELLIER
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>2</b>	<b>Nom</b>	BOUT
	<b>Prénoms</b>	Daniel
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	41, rue du Maréchal Reille
	<b>Code postal et ville</b>	3 7 3 9 0   CERELLES
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>3</b>	<b>Nom</b>	LEBRUN
	<b>Prénoms</b>	Maryse
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	15, rue Charles de Gaulle
	<b>Code postal et ville</b>	3 4 8 3 0   JACOU
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54


**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		MJPbv539/120
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
SOUCHES VACCINALES D'APICOMPLEXES DE LA FAMILLE DES SARCOCYSTIDAE.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - 75007 PARIS,		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange - 75016 PARIS,		
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS - 3, rue des Tanneurs - 37041 TOURS CEDEX 1		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	SOËTE
	Prénoms	Martine
Adresse	Rue	1 Place Courbet
	Code postal et ville	Apt 103
		[6 2 0 0 0] ARRAS
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	CEREDE
	Prénoms	Odile
Adresse	Rue	3, rue du Colonel Marchand
	Code postal et ville	[3 4 0 0 0] MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
  VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

La présente invention est relative à des souches mutantes atténuées d'Apicomplexes de la famille des *Sarcocystidae*, tels que *Toxoplasma* et *Neospora*, et à leurs utilisations vaccinales.

5 Le phylum des Apicomplexes (embranchement *Apicomplexa*), regroupe un grand nombre de parasites majoritairement intracellulaires. Ces parasites sont responsables de maladies telles que la toxoplasmose, la malaria, la néosporose, la coccidiose et la cryptosporidiose.  
10 Ils ont en commun un processus spécifique d'invasion de cellules hôtes en plusieurs étapes, conduisant à la formation d'une vacuole parasitophore dans laquelle le parasite se développe (MENARD et al., *Cell Microbiol.* 3 : 63-73, 2001 ; SOLDATI et al., *Int. J. Parasitol.* 31 : 1293-1302, 2001).

15 *Toxoplasma gondii* est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire, responsable de la toxoplasmose humaine et animale. Il appartient à la famille des *Sarcocystidae* qui regroupe également d'autres pathogènes majeurs de l'homme et de l'animal, tels que *Neospora* ou  
20 *Sarcocystis* (LEVINE, *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. Vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL, p.203, 1988 ; TENTER et al., *Int. J. Parasitol.* 32(5) : 595-616, 2002). Son cycle de vie présente deux aspects distincts : un cycle « asexué » chez un hôte intermédiaire, tel que l'homme, la souris, les ovins et  
25 les porcins, conduisant à la production de tachyzoïtes puis de kystes contenant des bradyzoïtes ; et un cycle « sexué » chez le chat conduisant à la production d'oocystes (contenant des sporozoïtes) éliminés dans les fèces.

La toxoplasmose animale pose un problème  
30 économique important dans le domaine de l'élevage agricole. Elle atteint tous les animaux de rente. La transmission à ces animaux se fait par l'ingestion d'oocystes, formes de résistance émises dans l'environnement par des chats infectés par un toxoplasme pathogène. Chez les ovins, les caprins et  
35 les porcs infectés pendant la gestation, elle provoque des avortements. Dans l'Union Européenne dont le cheptel ovin est estimé à 100 millions de têtes, 1 million d'agneaux sont perdus chaque année du fait d'avortements toxoplasmiques.

Par ailleurs la consommation de viande (surtout mouton et porc) infectée par la présence de bradyzoïtes, est la principale source des infections humaines. Contractée pendant la grossesse, la toxoplasmose est la 2<sup>ème</sup> cause des malformations congénitales. En outre, au cours des vingt dernières années, ce parasite est apparu comme un pathogène opportuniste, à l'origine d'encéphalites chez les patients sidéens.

La mise au point de vaccins conférant une protection contre les parasitoses à *Apicomplexa*, fait l'objet de nombreuses recherches. Deux stratégies principales sont employées : 1) l'identification d'antigènes parasitaires capables d'induire une réponse immune protectrice, et l'incorporation de ces antigènes dans des compositions vaccinales ; 2) la sélection de souches de parasites atténuées. Par exemple, dans le cas de la toxoplasmose, il a été proposé d'utiliser différentes souches atténuées de *Toxoplasma gondii* (Brevet US 5,045,313 ; Brevet US 4,473,549 ; Demande de Brevet US 2002/0164754 ; Demande de Brevet GB 2 204 323), pour conférer aux mammifères une immunité anti-toxoplasmes.

Les étapes clefs de l'infection par les Apicomplexes, et en particulier par *Toxoplasma gondii*, sont l'attachement du parasite aux cellules-hôtes, suivi de l'invasion de celles-ci. L'appareil invasif des Apicomplexes implique l'exocytose séquentielle de deux types d'organelles sécrétoires : les micronèmes et les rhoptries.

De récentes études ont mis en évidence le rôle central des micronèmes dans la reconnaissance des cellules-hôtes, et l'adhésion à celles-ci. Les protéines des micronèmes, désignées sous l'appellation générique « MICs » contiennent des modules homologues aux domaines d'adhésion de protéines d'eucaryotes supérieurs (TOMLEY et SOLDATI, Trends Parasitol. 17 : 81-88, 2001).

Une douzaine de protéines MICs sont actuellement connues chez *Toxoplasma gondii* (SOLDATI et al., Int. J. Parasitol. 31 : 1293-1302, 2001). Certaines d'entre elles sont des protéines transmembranaires, par exemple MIC2 de



*Toxoplasma gondii*, dénommée TRAP chez *Plasmodium* (MATUSCHEWSKI et al., EMBO J. 21 : 1597-1606, 2002) ; les autres sont des protéines solubles qui sont ciblées vers les micronèmes et redistribuées à la surface du parasite au cours de l'invasion, en association avec les protéines transmembranaires.

Récemment, deux protéines solubles MIC1 et MIC3, capables de se lier à la surface de cellules hôtes, ont été caractérisées chez *T. gondii* (ACHBAROU et al., Mol. Biochem. Parasitol., 47, 223-233, 1991 ; FOURMAUX et al., Mol. Biochem. Parasitol. 83 : 201-210, 1996 ; GARCIA-REGUET et al., Cell. Microbiol. 2 : 353-364, 2002).

La protéine MIC1 contient un domaine dupliqué en tandem possédant une lointaine homologie avec le domaine de type TSP-1 de TRAP, et présente une spécificité de liaison au lactose (LOURENCO et al., Glycobiol. 11 : 541-547, 2001).

La protéine MIC3 est un dimère de poids moléculaire apparent de 90 kDa formé de deux sous-unités de 38 kDa reliées par des ponts disulfures. MIC3 contient cinq domaines de type EGF dont deux sont chevauchants, et un domaine de type « domaine de liaison à la chitine », riche en ponts disulfures, et qui apparaît nécessaire pour la liaison à la surface de la cellule hôte (GARCIA-REGUET et al., 2000, précité; CEREDE et al., EMBO J. 21: 2526-2536, 2002).

MIC1 et MIC3 s'associent à d'autres protéines MICs pour former deux complexes indépendants, MIC1/4/6 et MIC3/8. Les protéines transmembranaires MIC6 et MIC8 jouent le rôle de transporteurs pour cibler respectivement les protéines MIC1/4 et MIC3 vers les micronèmes. La protéine MIC1 est indispensable pour que le complexe MIC1/4/6 puisse quitter les compartiments précoces de la voie de sécrétion (REISS et al., J. Cell Biol. 152 : 563-578, 2001).

Il a récemment été montré que la protéine MIC3 de *Toxoplasma gondii* constitue un antigène vaccinal majeur, suscitant une réponse immunitaire humorale précoce et très forte (Demande PCT WO 01/64243).

Dans le but d'étudier le rôle de MIC1 et MIC3 dans la capacité d'invasion et la virulence de *Toxoplasma*

*gondii*, les Inventeurs ont construit des souches mutantes de *T. gondii*, dans lesquelles l'une et/ou l'autre des adhésines MIC1 et MIC3 ont été inactivées.

5 Ils ont constaté que l'inactivation de MIC1 diminue d'environ 50% la capacité d'invasion des fibroblastes *in vitro*, alors que celle de MIC3 ne modifie pas cette capacité d'invasion ; l'inactivation simultanée des deux protéines ne modifie pas significativement la capacité d'invasion par rapport à l'inactivation de MIC1 seule. La virulence *in vivo* n'est que très peu affectée par l'inactivation isolée de MIC1 et MIC3 ; en revanche, elle est fortement diminuée par l'inactivation simultanée des deux protéines.

15 Les Inventeurs ont en outre constaté que malgré l'absence des antigènes majeurs que constituent MIC1 et MIC3, une souche double mutante de *Toxoplasma gondii* dans laquelle ces deux protéines sont inactivées permet d'obtenir une protection vaccinale efficace vis-à-vis de la toxoplasmose.

20 Ils ont ensuite entrepris d'étudier les caractéristiques infectieuses et protectrices de ladite souche sur l'animal, en particulier sur les souris et les brebis.

25 Ils ont ainsi mis en évidence que la vaccination par cette souche protège les animaux contre la formation de kystes cérébraux lors d'une ré-infection par une souche sauvage pathogène de *Toxoplasma gondii* ; ce qui diminue considérablement la portée d'une infection par cette souche sauvage pathogène, le risque de passage transplacentaire dans le cas de femelles gestantes, et la possibilité de transmission par consommation de la viande des animaux vaccinés, et donc à terme permet de faire baisser la prévalence générale de l'infection.

30 La présente invention a donc pour objet une souche mutante d'un Apicomplexe de la famille des *Sarcocystidae*, comprenant une mutation inactivant l'adhésine MIC1 et une mutation inactivant l'adhésine MIC3.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit *Sarcocystidae* est choisi parmi *Toxoplasma* et *Neospora*.

5 Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation ladite souche mutante est une souche de toxoplasme, notamment de *Toxoplasma gondii*.

On entend ici par :

- « mutation inactivant l'adhésine MIC1 » toute mutation résultant dans l'absence d'expression de MIC1, ou  
10 dans l'expression d'une protéine MIC1 non-fonctionnelle, c'est-à-dire incapable de former un complexe avec les protéines MIC4 et MIC6, ou incapable de lier le lactose.

- « mutation inactivant l'adhésine MIC3 » toute mutation résultant dans l'absence d'expression de MIC3, ou  
15 dans l'expression d'une protéine MIC3 non-fonctionnelle, c'est-à-dire ayant perdu sa fonction de liaison à la surface d'une cellule-hôte.

Des exemples de mutations résultant dans l'absence d'expression de MIC1 ou de MIC3 sont notamment la  
20 délétion de la totalité du gène correspondant, ou de sa région codante, ou de sa région promotrice. Des exemples de mutations résultant dans l'expression d'une protéine MIC3 non-fonctionnelle sont notamment des mutations affectant la région du gène *mic3* codant pour le domaine de type :  
25 « domaine de liaison à la chitine de la protéine MIC3 », à savoir les acides aminés 84-144 de ladite protéine. Il peut s'agir notamment de mutations affectant au moins le tryptophane en position 126 ou la phénylalanine en position 128 de la protéine MIC3.

30 Ces mutations peuvent être effectuées de manière classique par insertion, délétion, ou substitution d'une ou plusieurs bases au niveau de la séquence visée.

A titre d'exemples non-limitatifs de techniques de mutagenèse et de transformation utilisables chez les  
35 toxoplasmes, on citera notamment celles décrites dans les publications suivantes : KIM et al., (Science 262 : 911-914, 1993) ; DONALD et ROOS, (Mol. Biochem. Parasitol. 63 : 243-253, 1994) ; SOLDATI et al., (Mol. Biochem. Parasitol. 74 :

87-97, 1995) ; DONALD et ROOS, (Mol. Biochem. Parasitol. 91 : 295-305, 1998).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une souche mutante d'*Apicomplexa*, et notamment de toxoplasme, conforme à l'invention, pour l'obtention d'un vaccin destiné à conférer une immunité protectrice contre une parasitose à *Apicomplexa*, en particulier contre la toxoplasmose.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin caractérisé en ce qu'il comprend en tant que principe actif, une souche mutante d'*Apicomplexa* et notamment de toxoplasme, conforme à l'invention, telle que définie précédemment.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de construction de mutants de *Toxoplasma gondii* dans lesquels MIC1 et/ou MIC3 sont inactivées, et d'utilisation vaccinale d'un double mutant dans lequel MIC1 et MIC3 sont inactivées.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### **EXEMPLE 1 : INACTIVATION DE MIC1 ET/OU MIC3 CHEZ *T. GONDII*.**

##### **Plasmides utilisés :**

Les plasmides pmic3KO-1 et pmic3KO-2 ont été utilisés respectivement pour construire le simple mutant mic3KO à partir de la souche RHhxgprt<sup>-</sup> et le double mutant mic1-3KO à partir de la souche mic1KO. Les plasmides pM3MIC3ty et pM2MIC1myc + pM3MIC3 ont été utilisés respectivement pour restaurer l'expression de MIC3 dans le mutant mic3KO (souche mic3KO+MIC3), et pour restaurer l'expression de MIC1 et MIC3 dans le double mutant mic1-3KO (souche mic1-3KO+MIC1-3)

##### **Plasmide pmic3KO-1**

La région 3'UTR du gène *Mic3* (2136 pb) a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pBlueMIC3 (CEREDE et

al., 2002, précité), qui résulte de l'insertion d'un fragment d'ADN génomique de 2247 pb (GenBank AJ132530) de *T.gondii* au site NotI du plasmide pBluescript II® SK(-).

Pour l'amplification, les amorces ML9 :  
 5 5'-GTGTAAGCTTCAGCGAGTCTCTGAGAG-3' (SEQ ID NO : 1) et ML10 :  
 5'-GGGGTACCGAGCTCATGAGCAGAAGCTGCCAG-3' (SEQ ID NO : 2) ont  
 été utilisées. La zone amplifiée a été clonée entre les sites  
 de restriction HindIII et KpnI du plasmide pminiHXGPRT  
 (DONALD ET ROOS, 1998, précité). Un fragment d'ADN de 1977 pb  
 10 de la région 5'UTR de *Mic3*, a été obtenu par digestion  
 XbaI/NheI d'un fragment EcoRI de 3,5 kb de la séquence  
 génomique en 5' de *Mic3*, et cloné au site XbaI de  
 pminiHXGPRT.

Le plasmide résultant, qui contient le marqueur  
 15 de sélection HXGPRT (hypoxanthine-xanthine-guanine  
 phosphoribosyl transférase), encadré par les régions  
 flanquant en 3' et 5' l'ORF de *mic3*, a été dénommé pmic3KO-1.

#### **Plasmide pmic3KO-2**

Les régions 3'UTR et 5'UTR de *mic3*, obtenues  
 20 comme décrit ci-dessus, ont été insérées dans le plasmide  
 pTUB/CAT (KIM et al., 1993, précité), de part et d'autre de  
 la séquence codant pour le marqueur de sélection  
 chloramphénicol acétyl transférase (CAT), aux mêmes sites de  
 restriction que ceux décrits pour le plasmide pmniHXGPRT.

25 Le plasmide résultant, contenant le marqueur de  
 sélection CAT, encadré par les régions flanquant en 3' et 5'  
 l'ORF de *mic3*, a été dénommé pmic3KO-2.

#### **Plasmide pM3MIC3ty**

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide  
 30 pT8GFPPfmyoAtail (HETMANN et al., Mol. Biol. Cell 11 : 1385-  
 1400, 2000), dans lequel a été ajouté un épitope TY (BASTIN  
 et al., Mol. Biochem. Parasitol. 77(2) : 235-239, 1996) entre  
 les sites NsiI et PacI. Ce plasmide contient le promoteur de  
 la tubuline entre les sites KpnI et EcoRI et le gène codant  
 35 pour la GFP bordé des sites EcoRI et NsiI.

La région du promoteur de *Mic3* (562 pb) a été  
 amplifiée par PCR à partir du plasmide pBlueMIC3 avec les

amorces ML23 : 5'-CTGAATTCAGATCTTACCAGTGTGGACAAGG-3' (SEQ ID NO : 3) et ML24 : 5'-GGGGTACCCCTTGCTAGGTAACCACTCGTGC-3' (SEQ ID NO : 4), et insérée à la place du promoteur de la tubuline aux sites KpnI et EcoRI.

5 L'amorce ML24 permet d'introduire un site de restriction BglII en amont du site EcoRI et de cloner ensuite le gène *Mic3* à la place du gène codant pour la GFP aux sites BglII et NsiI.

10 La séquence codant pour MIC3 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pBlueMIC3 avec les amorces ML11 : 5'-GCACAATTGAGATCTAAAATGCGAGGCGGGACGTCC-3' (SEQ ID NO : 5) et ML15 : 5'-TGCTATGCATTCTAGGCTGCTTAATTTTCTCACACGTCAC-3' (SEQ ID NO : 6) introduisant respectivement les sites de restriction BglII et NsiI.

#### 15 **Plasmides pM2MIC1myc et pM3MIC3**

20 Le plasmide pM2MIC1myc (REISS et al., J. Cell Biol. 152 : 563-578, 2001) exprime la protéine MIC1, étiquetée par l'épitope myc à son extrémité C-terminale, sous le contrôle des séquences flanquantes en 5' et en 3' du gène *Mic2*

25 Le plasmide pM3MIC3 a été construit par clonage d'un fragment PvuI/SacI de 2072 pb du vecteur pBlueMIC3, contenant le gène *Mic3* et ses régions flanquantes en 5' et en 3', entre les sites SacI et PacI du vecteur pT/230-TUB5/BLE (SOLDATI et al., Mol. Biochem. Parasitol. 74 : 87-97, 1995) contenant une cassette d'expression exprimant le marqueur de sélection à la phléomycine.

#### 30 **Construction des souches mutantes mic3KO et mic1-3KO, et des souches mutantes complémentées mic3KO+MIC3, et mic1-3KO+MIC1-3**

L'haploïdie du génome des Apicomplexes lors de la phase proliférative permet l'invalidation du gène *Mic3*, en une seule recombinaison homologue.

35 Tous les *T. gondii* utilisés ont été produits en fibroblastes humains (HFF) cultivés en milieu minimal de Dulbecco (DMEM) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (FCS), 2 mM glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de

streptomycine. Ils ont été récoltés lors de la lyse des cellules hôtes.

#### **Souche mic3KO**

La souche de *T. gondii* utilisée pour la mutagenèse est la souche RHhxgprt<sup>-</sup> (DONALD et ROOS, 1998, précité), déficiente pour le gène de l'hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HXGPRT), et de ce fait sensible à l'acide mycophénolique.

80-100 µg de plasmide pmic3KO-1 purifié puis linéarisé par KpnI ont été ajoutés à 10<sup>7</sup> tachyzoïtes RHhxgprt<sup>-</sup> mis en suspension dans du milieu d'électroporation CYTOMIX (VAN DEN HOFF et al., Nucleic Acids Res. 20 : 2902, 1992), et l'électroporation a été réalisée en cuvette d'écart 4 mm, dans un volume de 800 µl sur appareil BTX Electrocell Manipulator (Paramètres : 2 kV, R=48 ohms).

Après électroporation, les tachyzoïtes ont été déposés sur une monocouche de cellules HFF en culture. Pour la sélection des mutants, le lendemain de l'électroporation, le milieu de culture a été supplémenté par l'agent de sélection (25 µg/ml d'acide mycophénolique et 50 µg/ml de xanthine), et trois passages en culture sont effectués dans ce milieu.

Cinq jours après le dernier passage, les parasites sont clonés par dilution limite dans les puits d'une plaque à 96 puits de cellules HFF, en présence d'agent de sélection, et les clones retenus sont amplifiés.

#### **Souche mic1-3KO**

La souche de *T. gondii* utilisée pour la mutagenèse est la souche mic1KO (REISS et al., J. Cell Biol. 152 : 563-578, 2001) qui dérive de la souche RHhxgprt<sup>-</sup> décrite ci-dessus par délétion du gène *Mic1* remplacé par le gène codant pour l'HXGPRT dans la souche mic1KO.

80-100 µg de plasmide pmic3KO-2 purifié puis linéarisé par KpnI ont été ajoutés à 10<sup>7</sup> tachyzoïtes mic1KO pour une électroporation dans les conditions décrites ci-dessus.

Les mutants ont été sélectionnés et clonés comme décrit ci-dessus, en présence de 20  $\mu$ M de chloramphénicol comme agent de sélection.

Les mutants dans lesquels MIC3 a été inactivée sont dénommés mic3KO, et ceux dans lesquels MIC1 et MIC3 ont été inactivées sont dénommés mic1-3KO.

**Souche mic3KO+MIC3**

L'expression de MIC3 a été restaurée par co-transfection des parasites mic3KO avec 100  $\mu$ g du vecteur pM3MIC3ty, et 10  $\mu$ g du plasmide pTUB/CAT.

La sélection a été effectuée en présence de 20  $\mu$ M de chloramphénicol comme décrit ci-dessus.

La souche mic3KO complémentée par MIC3 est dénommée mic3KO+MIC3.

**Souche mic1-3KO+MIC1-3**

L'expression de MIC1 et MIC3 a été restaurée par co-transfection des parasites mic1-3KO avec 100  $\mu$ g du vecteur pM2MIC1myc, et 10  $\mu$ g du plasmide pM3MIC3.

Les mutants ont été sélectionnés et clonés comme décrit ci-dessus, en présence de 10  $\mu$ g/ml de phléomycine comme agent de sélection.

La souche mic1-3KO complémentée par MIC1 et MIC3 est dénommée mic1-3KO+MIC1-3.

Les protéines totales des mutants mic3KO, mic1-3KO, mic3KO+MIC3, et mic1-3KO+MIC1-3 ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE et transfert de Western. Après extraction des protéines totales par ébullition des cellules dans du tampon SDS (en présence ou non de DTT 0,1 M) et séparation sur gels de polyacrylamide 10%, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les transferts de Western ont été marqués comme décrit par GARCIA-REGUET et al. (1998, précité) à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MIC3 (T42F3 au 1:400) et anti-MIC1 (T101F7) puis détectés par des IgG de chèvre anti-souris conjugués à la phosphatase alcaline (1:1000). Les résultats sont présentés dans la Figure 1.

Légende de la Figure 1 :



- 1 = souche sauvage de *Toxoplasma gondii* RH
- 2 = mutant mic3KO
- 3 = mutant mic3KO+MIC3
- 4 = mutant mic1KO (REISS et al., 2001)
- 5 = mutant mic1KO+MIC1 (REISS et al., 2001)
- 6 = mutant mic1-3KO
- 7 = mutant mic1-3KO+MIC1-3

Les résultats montrent que l'expression de MIC3 est indétectable dans mic3KO (2) et mic1-3KO (6) mais est restaurée dans mic3KO+MIC3 (3) et mic1-3KO+MIC1-3 (7). L'expression de MIC1 est indétectable dans mic1KO (4) et mic1-3KO (6) mais est restaurée dans mic1KO+MIC1 (5) mic1-3KO+MIC1-3 (7).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence. Les tachyzoïtes cultivés une nuit sur monocouche de cellules HFF, ont été lavés en PBS, et fixés par du formaldéhyde 4% pendant 20 min. Après 3 lavages, les cellules HFF infectées ont été perméabilisées avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS pendant 10 min, la réaction a été arrêtée par 10% de sérum de bœuf fœtal (FBS) pendant 30 min., puis les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire (mAb anti-MIC1 T101F7, mAb anti-MIC3 T42F3) dilué dans 2% FBS pendant 40 min., lavées et puis incubées avec un anticorps secondaire (chèvre anti-souris couplé au FITC, et rouge Texas chèvre anti-lapin). Les observations ont été réalisées sur un microscope Leica DMRA2 équipé pour l'épifluorescence et les images ont été enregistrées avec une caméra Princeton coolSNAP CCD.

Les résultats montrent qu'aucune protéine MIC3 n'est détectable dans des tachyzoïtes mic3KO, alors qu'une expression de MIC3 de type sauvage est observée dans les micronèmes des souches complémentées (mic3KO+MIC3, mic1-3KO+MIC1-3). La complémentation de MIC1 dans mic1KO+MIC1 et mic1-3KO+MIC1-3 conduit à une certaine accumulation de MIC1 dans la vacuole parasitophore et dans l'espace périnucléaire.

## EXEMPLE 2 : EFFETS DE L'INACTIVATION DE MIC1 ET/OU MIC3 SUR LES PROPRIETES INFECTIEUSES DE *T. GONDII*

Les mutants de *Toxoplasma gondii* décrits à l'exemple 1 ci-dessus, ont été entretenus par passages réguliers sur cellules HFF cultivées en milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (FCS), 2 mM glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

### Capacité d'invasion

2x10<sup>5</sup> tachyzoïtes de mic1KO, mic1KO+MIC1, mic3KO et mic1-3KO purifiés ont été ajoutés à des cellules HFF cultivées sur des lamelles couvre-objet en verre. Les cellules ont été fixées pendant 12h puis colorées en utilisant un mélange bleu de méthylène-éosine (kit RAL 555), et montées sous lamelles, de façon permanente (PERTEX, Microm, France). Le nombre de vacuoles parasitaires, représentant la capacité d'invasion du parasite, a été compté dans 10 champs sélectionnés aléatoirement par lamelle, et les données ont été présentées comme la moyenne de vacuoles par champ provenant de 4 lamelles, sur la base de 5 répétitions indépendantes.

Le contrôle a été réalisé dans les mêmes conditions avec la souche RHxgprt<sup>-</sup>, dont la capacité d'invasion est comparable à celle de la souche sauvage RH de *Toxoplasma gondii*.

Les résultats sont présentés dans la Figure 2 (\*\*\*) = invasion significativement inférieure, p<0,001).

Les résultats montrent que la capacité d'invasion des parasites mic1KO est diminuée d'environ 50% par rapport à celle de la souche contrôle RHxgprt<sup>-</sup>.

En revanche, la capacité d'invasion des parasites mic3KO et de ceux de la souche contrôle est comparable (Figure 2A). La capacité d'invasion des parasites mic1-3KO n'est pas significativement différente de celle des mutants mic1KO (Figure 2A), indiquant que MIC1 et MIC3 n'ont pas de fonction additive dans l'invasion des fibroblastes par *Toxoplasma gondii*.

La complémentation de *mic1*KO par *MIC1* restaure la capacité d'invasion à un niveau comparable de celui de la souche contrôlée (Figure 2B).

### Virulence

5 Les souris meurent généralement 9 jours après une infection par voie intrapéritonéale par 20 tachyzoïtes de la souche sauvage RH de *Toxoplasma gondii*.

10 L'étude de la virulence des mutants *mic1*KO, *mic3*KO, *mic1-3*KO, *mic1*KO+*MIC1*, *mic3*KO+*MIC3* et *mic1-3*KO+*MIC1-3* a été réalisée sur un lot de 10 souris mâles OF1 par injection intrapéritonéale de 20 tachyzoïtes/souris de la souche *mic1-3*KO, et en suivant le devenir des souris infectées.

15 Les contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions sur un lot de 9 souris mâles OF1 en utilisant la souche RHxgprt<sup>-</sup>, dont la virulence est comparable à celle de la souche sauvage RH de *Toxoplasma gondii*.

Les résultats sont représentés par la Figure 3.

Légende des Figures 3A, 3B et 3C :

20 ♦ = souche *mic1*KO (A); souche *mic3*KO (B); souche *mic1-3*KO (C)

■ = souche *mic1*KO+*MIC1* (A) ; souche *mic3*KO+*MIC3*; souche *mic1-3*KO+*MIC1-3* (C)

Δ = souche RHxgprt<sup>-</sup> (A, B et C)

25 Toutes les souris infectées par la souche RHxgprt<sup>-</sup> sont mortes 9 jours après l'infection. Les souris infectées par *mic1*KO ou *mic3*KO présentent un léger retard de la mortalité (mort des souris entre 9 et 22 jours après l'infection), qui n'est pas observé dans le cas des souris infectées par les mutants complémentés *mic1*KO+*MIC1* et *mic3*KO+*MIC3*. Une seule des souris infectée par *mic3*KO est demeurée en vie 44 jours après infection, et cet animal a développé une réponse anticorps spécifique de *T. gondii* (résultats non présentés). Ces résultats indiquent que  
30 l'inactivation isolée des gènes *Mic1* ou *Mic3* ne conduit qu'à  
35 une légère diminution de la virulence chez les souris.

En revanche, dans le cas des souris infectées par la souche mic1-3KO, on observe une survie quasi totale (90% de survie 40 jours après l'infection). La complémentation de mic1-3KO par MIC1 et MIC3 (souche mic1-3KO+MIC1-3) restaure complètement la virulence des parasites.

Les souris ont également été infectées avec différentes quantités du double mutant mic1-3KO et la dose létale (DL100) de mic1-3KO a été comparée avec celle de la souche contrôle RHxgprt<sup>-</sup>. Alors que la DL100 à 9 jours de la souche contrôle est inférieure à 20 tachyzoïtes, celle de la souche mic1-3KO est de l'ordre de  $2 \times 10^3$  tachyzoïtes.

### **EXEMPLE 3 : IMPLICATION DE LA FONCTION D'ADHESION DE MIC3 DANS LA VIRULENCE DE TOXOPLASMA GONDII**

#### **Détermination de résidus impliqués dans la fonction d'adhésion de MIC3**

Il a été montré (CEREDE et al., 2002, précité) que le domaine de type « domaine de liaison à la chitine », de MIC3 est essentiel pour la liaison à la surface de la cellule hôte.

Différentes mutations ont été introduites dans ce domaine, afin de déterminer les résidus essentiels à la fonctionnalité de MIC3.

Les mutations effectuées sont les suivantes :

-substitution de l'un des résidus cystéine aux positions 102 (mutant C102G), 107 (mutant C107G), 108 (mutant C108G), par un résidu glycine ;

-substitution du résidu proline en position 103 par un résidu alanine (mutant P103A) ;

-substitution de l'un des résidus sérine aux positions 109 (mutant S109A) et 130 (mutant S130A) par un résidu alanine ;

-substitution de l'un des résidus tyrosine aux positions 96 (mutant Y96A), 135 (mutant Y135A), et 141 (mutant Y141A), par un résidu alanine ;

-substitution de l'un des résidus phénylalanine aux positions 97 (mutant F97A), 121 (mutant F121A), et 128 (mutant F128A) , par un résidu alanine ;

-substitution du résidu tryptophane en position 126 par un résidu alanine (mutant W126A).

Les positions des mutations sont indiquées par référence à la séquence polypeptidique du précurseur de MIC3 (Genbank CAB56644).

Les mutations ont été effectuées par mutagenèse dirigée par PCR (Quickchange®, Stratagène), de la séquence codant pour la forme mature de MIC3, contenue dans le plasmide pOC2 (CEREDE et al., 2002, précité).

Les plasmides obtenus sont respectivement dénommés pC102 (mutant C102G), pC107 (mutant C107G), pC108 (mutant C108G), pP103 (mutant P103A), pS109 (mutant S109A), pS130 (mutant S130A), pY96 (mutant Y96A), pF97 (mutant F97A), pF121 (mutant F121A), pW126 (mutant W126A), pF128 (mutant F128A), pY135 (mutant Y135A), et pY141 (mutant Y141A).

Les plasmides ont été purifiés en utilisant le kit Qiagen kit® (Qiagen), et la présence des mutations attendues vérifiée par séquençage.

Les protéines MIC3 mutantes ont été exprimées par transfection de cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney, ATCC CCL-10) cultivées dans du milieu BHK-21 (Gibco-BRL) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (FCS) 5%, 2 mM de tryptose, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Pour chaque plasmide,  $3 \times 10^5$  cellules BHK-21 préalablement cultivées sur des lamelles couvre-objet pendant 24h dans des plaques 24 puits, ont été transfectées avec le plasmide purifié, à l'aide de Lipofectamine®, selon les conditions préconisées par le fabricant (Gibco-BRL). Les cellules ont été cultivées 24h de plus avant l'analyse.

Les propriétés de liaison des protéines MIC3 mutantes ont été étudiées en analysant leur localisation dans les cellules BHK-21 transfectées. Les cellules BHK-21 transfectées ont été fixées par du paraformaldéhyde 3% dans du PBS pendant 15 min, puis lavées et perméabilisées avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS pendant 10 min. Les lamelles portant les cellules ont ensuite été lavées dans du PBS contenant 0,5% de SAB, et incubées pendant 1h dans le même

tampon contenant un anticorps anti-MIC3 (T82C10, 1 :200) ou anti-V5 (1 :500), puis pendant 1h avec une IgG de chèvre conjuguée à la TRITC (Sigma, 1 :400), avec plusieurs lavages en PBS entre chaque incubation. Les lamelles ont ensuite été lavées et montées sur des lames de microscope. La visualisation a été effectuée à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Quatre catégories de mutants ont été définies selon leur localisation.

Dans la première catégorie (mutants C102G, C107G, C108G, Y141A, F121A), la protéine est retenue dans le système sécrétoire ; dans la seconde catégorie (Y135A, Y96A, F97A, S109A, P103A) la protéine est sécrétée normalement et se lie à la surface des cellules transfectées, comme le fait la protéine MIC3 mature de type sauvage ; dans la troisième catégorie, (W126A, Y128A) la protéine est sécrétée normalement mais ne se lie pas à la surface des cellules transfectées ; dans la quatrième catégorie (S130A), la protéine est sécrétée normalement et se lie à un réseau de matériel cellulaire déposé par les cellules à la surface des plaques de verre.

Ces résultats montrent que toutes les mutations affectant un résidu cystéine conduisent à un défaut majeur de sécrétion ; les protéines MIC3 mutantes correspondantes s'accumulent sous forme de larges vésicules périnucléaires, indiquant que ces protéines sont mal repliées ou assemblées de manière incomplète. Ce résultat est cohérent avec le rôle des cystéines dans le repliement du domaine.

En ce qui concerne les autres substitutions, les deux mutations F121A et Y141A affectent également la sortie des protéines. Les autres mutants (Y135A, Y96A, F97A, S109A, P103A, W126A, F128A, S130A) sont tous exprimés sous forme de dimère et sécrétés. Deux d'entre eux (W126A, Y128A) ne se lient pas aux cellules BHK-21 transfectées. Du fait de la perte de ces propriétés de liaison, ces deux mutants sont abondamment sécrétés dans le surnageant. Dans le cas du mutant S130A, le marquage par les anticorps anti-MIC3 n'est pas associé avec la membrane plasmatique de la cellule

transfectée, comme dans le cas de la protéine MIC3 de type sauvage, mais avec l'espace intercellulaire, comme si la protéine R-MIC3 S130A était liée au matériel cellulaire déposé sur les plaques.

Ces résultats montrent que les deux résidus aromatiques W126 et Y128 sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur de la surface de la cellule hôte, et que le résidu S130 pourrait également contribuer aux propriétés de liaison de MIC3 en participant à la spécificité d'interaction.

#### **Implication des résidus W126 et Y128 dans la virulence de *T. gondii*.**

Pour étudier le rôle de la fonction d'adhésion de MIC3 dans la virulence de *T. gondii*, des expérimentations de complémentation de la souche double mutante mic1-3KO par les mutants W126A et F128A ont été effectuées.

Les plasmides pM3MIC3W126A, pM3MIC3F128A, et pM3MIC3Y135A, ont été construits à partir du plasmide pM3MIC3. Ces plasmides portent le gène de sélection à la phléomycine, et expriment respectivement les mutants W126A, F128A, et Y135A. La présence des mutations attendues a été vérifiée par séquençage.

La souche mic1-3KO a été transfectée par les plasmides pM3MIC3W126A (souche mic1-3KO+MIC3W126A) ou pM3MIC3F128A (souche mic1-3KO+MIC3F128A). A titre de contrôles de liaison positifs la souche mic1-3KO+MIC3 et la souche mic1-3KO transfectée par le plasmide pM3MIC3Y135A (mic1-3KO+MIC3Y135A) ont été utilisées.

L'expression des protéines MIC3 dans les différentes souches a été analysée par transfert de Western, et leurs propriétés de liaison ont été analysées par transfert de cellules. Le transfert de cellules a été réalisé avec un double de la feuille de nitrocellulose utilisée pour le transfert de Western, incubée avec une suspension de cellules Mode-K (VIDAL et al., J. Immunol. Methods 166 : 63-73, 1993) cultivées dans du milieu RPMI (Bio Whittaker) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (FCS), 25 mM

d'Hepes, 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Les résultats sont présentés dans les Figures 4A (transfert de Western) et 4B (transfert de cellules).

5 Légende des Figures 4A et 4B :

1 = souche sauvage de *Toxoplasma gondii* RH

2 = souche mic1-3KO+MIC3

3 = souche mic1-3KO+MIC3W126A

4 = souche mic1-3KO+MIC3F128A

10 5 = souche mic1-3KO+MIC3Y135A

Les résultats du transfert de Western montrent l'expression de protéines MIC3 dans toutes les souches. Toutes ces protéines migrent à la taille attendue pour un dimère en conditions réductrices. Cependant, les protéines  
15 W126A et Y135A ont migré plus vite que les autres, ce qui suggère une modification de conformation.

Les résultats du transfert de cellules montrent que comme attendu, les cellules se lient fortement à MIC3 native (1), MIC3myc (2), et à MIC3 Y135A (5). En revanche,  
20 les cellules sont incapables de se lier à MIC3 W126A (3) et MIC3 F128A (4). D'autre part, la modification de conformation de MIC3 Y135A n'affecte pas ses propriétés de liaison.

Les souches mic1-3KO+MIC3W126A, mic1-3KO+MIC3F128A, et à titre de contrôle, mic1-3KO+MIC3Y135A ont  
25 été utilisées pour analyser l'implication de la fonction d'adhésion de MIC3 dans la virulence chez la souris.

### **Analyse de la virulence des souches**

Le test de virulence a été réalisé comme décrit à l'exemple 2 : 20 tachyzoïtes de chaque parasite ont été  
30 injectées par voie intrapéritonéale dans des souris mâles OF1 (lot de 11 à 20 souris) dont la survie a été suivie pendant 40 jours. Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

Légende de la Figure 5 :

♦ = souche mic1-3KO

35 ■ = souche mic1KO

Δ = souche mic1-3KO+MIC3

○ = souche mic1-3KO+MIC3Y135A



+ = souche mic1-3KO+MIC3F128A

x = souche mic1-3KO+MIC3W126A

Comme attendu, les souris infectées avec mic1-3KO+MIC3 se comportent de la même façon que les souris infectées avec mic1KO, et meurent selon une cinétique similaire en 9-26 jours. La survie des souris infectées par la souche mic1-3KO+MIC3Y135A est supérieure (ce qui peut être dû à un adressage partiellement défectueux de la protéine MIC3 Y135A dans les vacuoles parasitophores).

En revanche, on observe, 40 jours après l'infection, une survie de respectivement 83,3% et 95% des souris infectées par la souche mic1-3KO+MIC3W126A et mic1-3KO+MIC3F128A.

Ces résultats montrent que la fonction de liaison de MIC3 aux cellules hôte est essentielle pour la virulence du parasite.

#### **EXEMPLE 4 : CARACTERISTIQUES PROTECTRICES DU MUTANT mic1-3KO**

Des expériences de vaccination contre *Toxoplasma gondii* par le mutant mic1-3KO ont été effectuées sur des souris et des brebis.

##### **I- Chez la souris**

##### **Protocole expérimental**

Des lots de souris mâles OF1 âgées de 9,5 semaines, ont été traités comme suit :

- 21 souris (lot 1) ont reçu le mutant mic1-3KO ;
- 21 souris (lot 2) ont reçu le mutant mic1-3KO puis ont été réinfectées environ 1 mois plus tard par la souche de *Toxoplasma gondii* kystogène 76K ;
- 10 souris (lot 3) ont été infectées par la souche de *Toxoplasma gondii* kystogène 76K lors de la réinfection du lot 2.

A J0, les souris des lots 1 et 2 ont reçu 20 tachyzoïtes du mutant mic1-3KO par voie intrapéritonéale.

A J14, l'infection des souris a été contrôlée par recherche de la présence d'IgG anti-*Toxoplasma gondii*, à l'aide d'extrait total de toxoplasme (souche RH).

A J37, les souris effectivement immunisées (présence d'IgG anti-toxoplasmes) du lot 2 (8 souris), et du lot 3 (8 souris) ont été gavées par 70 kystes de la souche de *Toxoplasma gondii* 76K.

5 A J61, les souris des trois lots ont été sacrifiées. On a recherché la présence d'IgG anti-MIC3, due à l'infection par *Toxoplasma gondii* 76K, (puisque la souche vaccinale mic1-3KO n'exprime pas cette protéine) et effectué un comptage des kystes cérébraux dans les broyats de cerveaux  
10 de ces souris (comptage sur cellule de Malassez ; la limite de détection est de 30 kystes par cerveau).

8 souris mâles OF1 naïves âgées de 15 semaines ont été gavées avec 1/3 du cerveau de chacune des 8 souris du lot 2 (contrôle de l'absence de parasites cérébraux). Une souris  
15 contrôle a reçu 60 kystes de la souche de *Toxoplasma gondii* 76K issus d'une souris du lot 3 (contrôle positif).

A J82, on a recherché la présence d'IgG anti-MIC3 chez les souris gavées à J61.

A J103, les souris ont été sacrifiées et un  
20 comptage des kystes cérébraux a été effectué.

## Résultats

### A J14

Sur les 42 souris des lots 1 et 2, 8 sont mortes vers J10, lors de la phase aiguë d'infection (ce qui reflète  
25 la sensibilité élevée des souris à la virulence résiduelle du mutant MIC1-3KO). Le contrôle de l'infection par détection des IgG dirigés contre les antigènes parasitaires montre que 16 souris sont négatives et donc non infectées. Les lots 1 et 2 sont donc respectivement réduits à 10 et 8 souris.

### A J61

#### Recherche d'IgG anti-MIC3

Aucune IgG anti-MIC3 n'a été détectée dans le sérum des souris du lot 1 (contrôle négatif), alors que la présence d'IgG anti-MIC3 a été détectée dans le sérum des  
35 souris du lot 3 (contrôle positif). La présence d'IgG anti-MIC3 a été détectée dans le sérum des souris du lot 2, à

l'exception d'une souris qui ne présente une très faible réponse.

#### *Comptage de kystes cérébraux*

A l'examen microscopique, Les cerveaux des souris du lot 1 ne contiennent pas de kystes cérébraux (contrôle négatif), alors que cerveaux des souris du lot 3 contiennent de 2250 à 7250 kystes/cerveau soit une moyenne de 4037 kystes/cerveau (contrôle positif). Chez les souris du lot 2, 7 souris ne contiennent pas de kystes cérébraux et une souris contient 30 kystes cérébraux (soit un seul kyste observé sur 16 comptages de 10 µl sur cellule de Malassez).

#### A J82

Les souris naïves gavées avec les cerveaux des souris du lot 2 présentent des IgG anti-MIC3. La souris contrôle ayant reçu 60 kystes de la souche de *Toxoplasma gondii* 76K issus d'une souris du lot 3 présente également des IgG anti-MIC3.

#### A J103

Les souris naïves gavées avec les cerveaux des souris du lot 2 présentent respectivement 500, 375, 1000, 250, 165, 125, 310 et 375 kystes cérébraux. A titre de comparaison, la souris contrôle ayant reçu 60 kystes de la souche de *Toxoplasma gondii* 76K présente 2250 kystes cérébraux.

#### 25 **Conclusion**

Les souris immunisées par le mutant *mic1-3KO* ne forment pratiquement pas de kystes cérébraux lors d'une ré-infection avec la souche de *Toxoplasma gondii* 76K (protection de 99,9%).

30 En revanche, plusieurs des cerveaux de souris re-infectées sont infectieux par voie orale, donc l'immunisation par la souche vaccinale *mic1-3KO* n'est pas totalement stérilisante lors d'une ré-infection.

## **II- Cas du mouton**

### **Protocole expérimental**

5 A J0, 2 brebis ont été vaccinées par voie sous-cutanée par  $2 \times 10^6$  parasites mutant mic1-3KO. La vaccination n'a provoqué qu'une fièvre passagère de  $41^\circ\text{C}$  (température normale =  $39^\circ\text{C}$ ) à J2-3.

A J47, Les brebis ont été mises à la reproduction.

10 A J133, les brebis vaccinées ont subi l'infection d'épreuve par administration per os de 400 oocystes, à 86 jours de gestation. Un groupe témoin constitué de 7 brebis non vaccinées a subi la même infection d'épreuve.

A partir de J133, les brebis ont été mises en observation clinique quotidienne.

### **15 Résultats**

Les 2 brebis vaccinées ont mis bas un agneau cliniquement sain à J196.

20 Dans le lot témoin non vacciné, les 7 brebis ont avorté, respectivement à J141 (1), J143 (2), J145 (1), J153 (1), J173 (1) et J183 (1).

## **III- Conclusion**

25 La vaccination par le mutant mic1-3KO protège les animaux contre la formation de kystes cérébraux lors d'une éventuelle ré-infection. Cette protection reflète la capacité du sujet vacciné à éliminer considérablement la portée d'une infection par une souche naturelle et donc de limiter aussi, dans le cas d'une femelle gestante, le passage transplacentaire qui est la source des pertes économiques dues à *Toxoplasma gondii*.

30 Par ailleurs, la diminution considérable de la charge kystique minimise considérablement la possibilité de transmission par consommation de la viande des animaux vaccinés, et permet donc à terme de faire baisser la prévalence générale de l'infection par *Toxoplasma gondii*.

## REVENDEICATIONS

1) Souche mutante d'un Apicomplexe de la famille des Sarcocystidae caractérisée en ce qu'elle comprend une mutation inactivant l'adhésine MIC1 et une mutation inactivant l'adhésine MIC3.

2) Souche mutante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de toxoplasme.

3) Souche mutante selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de *Toxoplasma gondii*.

4) Utilisation d'une souche mutante selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'obtention d'un vaccin.

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit vaccin est un vaccin anti-toxoplasmose.

6) Vaccin comprenant une souche mutante selon une quelconque des revendications 1 à 3

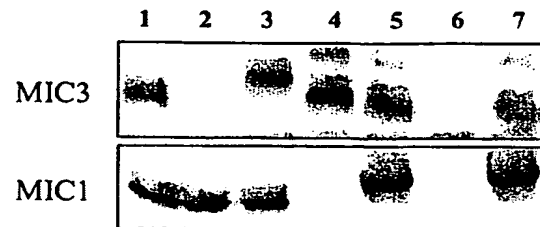


FIG. 1

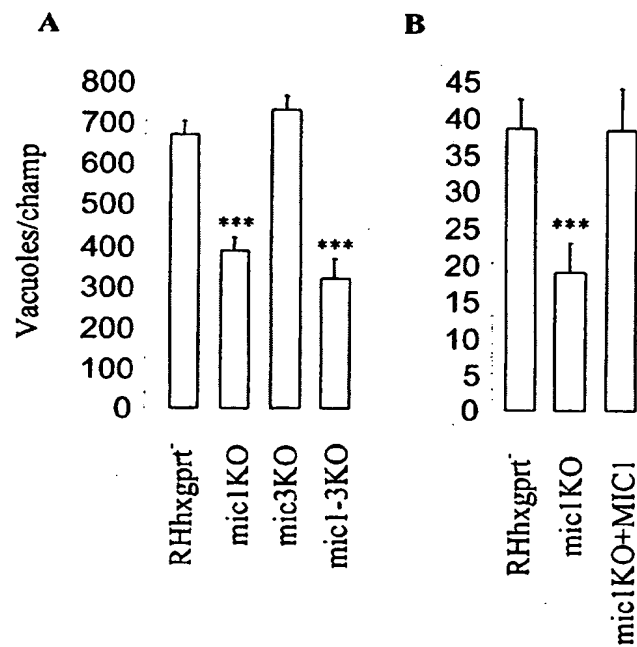


FIG. 2

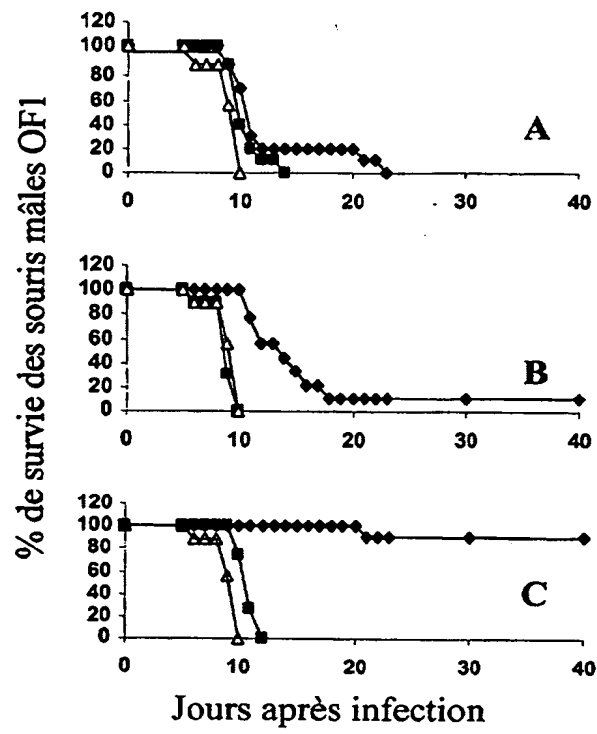


FIG. 3

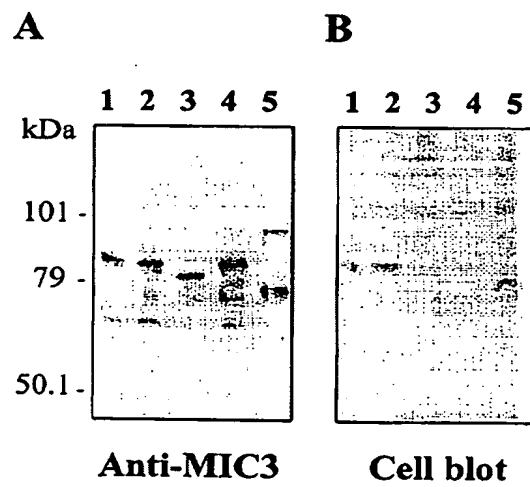


FIG. 4

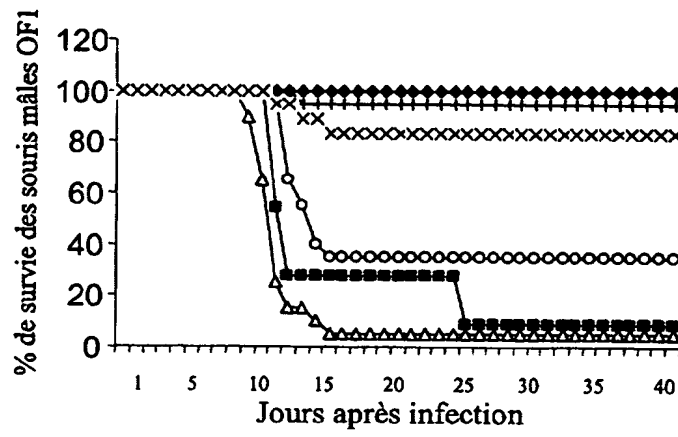


FIG. 5



## SEQUENCE LISTING

<110> Institut National de la Recherche Agronomique  
 Centre National de la Recherche Scientifique  
 Université François Rabelais

<120> SOUCHES VACCINALES D'APICOMPLEXES DE LA FAMILLE DES  
 SARCOCYSTIDAE

<130> MJPbv539/120

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Amorce PCR: ML9

<400> 1  
 gtgtaagctt cagcgagtct ctgagag 27

<210> 2  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Amorce PCR: ML10

<400> 2  
 ggggtaccga gctcatgagc agaagctgcc ag 32

<210> 3  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Amorce PCR: ML23

<400> 3  
 ctgaattcag atcttaccag tgttggacaa gg 32

<210> 4  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR: ML24

<400> 4  
ggggtacccc ttgctaggta accactcgtg c 31

<210> 5  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR: ML11

<400> 5  
gcacaattga gatctaaaat gcgaggcggg acgtcc 36

<210> 6  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR: ML15

<400> 6  
tgctatgcat tcctaggctg ctttaattttc tcacacgtca c 41

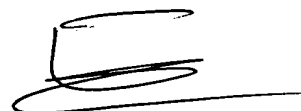
## VERIFICATION OF TRANSLATION

---

**I, Emeline METAY**  
**CABINET ORES**  
**36 rue de Saint Petersburg**  
**75008 PARIS**  
**FRANCE**

declare that I am conversant with the French and English languages, and that to the best of my knowledge and belief the following is a true and correct English translation of the FR 04 00260 filed on January 13, 2004.

Paris, November 29, 2010



**Emeline METAY**

FRENCH REPUBLIC



---

# PATENT

---

UTILITY CERTIFICATE – CERTIFICATE OF ADDITION

## OFFICIAL COPY

The Director-General of the Institut National de la Propriété Industrielle certifies that the attached document is a true copy of an application for industrial property titleright filed at the Institute.

Drawn up in Paris, 24 NOVEMBER 2010

On behalf of the Director-General of the  
Institut National de la Propriété Industrielle  
The Patent Department Head

[signature]

Martine PLANCHE

---

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

REGISTERED OFFICE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Telephone: 33 (0)1 53 04 53 04  
Fax: 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04 Fax: 33 (1) 42 94 86 54

1st filing

**PATENT**  
**UTILITY CERTIFICATE**  
Intellectual Property Code - Book VI



**BR1**

**REQUEST FOR GRANT**

page 1/2

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 540 @ W / 210502

<b>SUBMISSION OF DOCUMENTS</b> DATE <b>13 JAN. 2004</b> PLACE <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> NATIONAL REGISTRATION No. <b>04/00,260</b> ASSIGNED BY THE INPI DATE OF FILING ASSIGNED BY THE INPI <b>13 JAN. 2004</b>		<b>1</b> NAME AND ADDRESS OF THE APPLICANT OR THE REPRESENTATIVE TO WHOM THE CORRESPONDENCE IS TO BE ADDRESSED  CABINET ORES 36, rue de Saint-Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Your file references:</b> (optional) <b>MJPbv539/120</b>			
<b>Confirmation of filing by fax</b>		<input type="checkbox"/> No. assigned by the INPI to the fax	
<b>2 NATURE OF THE APPLICATION</b>		<b>Tick one of the 4 following boxes</b>	
Patent application		<input checked="" type="checkbox"/>	
Utility certificate application		<input type="checkbox"/>	
Divisional application		<input type="checkbox"/>	
Initial patent application		No.	Date <input type="text"/>
or initial utility certificate application		No.	Date <input type="text"/>
Conversion of a European patent application Initial application		<input type="checkbox"/> No.	Date <input type="text"/>
<b>3 TITLE OF THE INVENTION</b> (200 characters or spaces maximum)  APICOMPLEX VACCINE STRAINS OF THE FAMILY SARCOCYSTIDAE.			
<b>4 PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR FRENCH APPLICATION</b>		Country or organisation Date <input type="text"/> No. Country or organisation Date <input type="text"/> No. Country or organisation Date <input type="text"/> No. <input type="checkbox"/> If there are other priorities, tick the box and use the "continuation" form	
<b>5 APPLICANT</b> (Tick one of the 2 boxes)		<input checked="" type="checkbox"/> Legal entity <input type="checkbox"/> Natural person	
Name or company name		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE	
Forenames			
Legal form		Public Establishment	
SIREN No.		<input type="text"/>	
APE-NAF Code		<input type="text"/>	
Domicile or registered office	Street	147, rue de l'Université	
	Postcode and town	75 007 PARIS	
	Country		
Nationality			
Telephone No. (optional)		Fax No. (optional)	
E-mail address (optional)			
		<input checked="" type="checkbox"/> If there are other applicants, tick the box and use the "continuation" form	

The second page must be filled in



1st filing

**PATENT**  
**UTILITY CERTIFICATE**  
**REQUEST FOR GRANT**

**BR2**

page 2/2

SUBMISSION OF DOCUMENTS		Reserved for the INPI	
DATE		13 JAN. 2004	
PLACE		75 INPI PARIS 34 SP	
NATIONAL REGISTRATION No.		04/00,260	
ASSIGNED BY THE INPI			
DB 540 W / 210502			
<b>6 REPRESENTATIVE</b>			
Name		VIALLE-PRESLES	
Forename		Marie José	
Firm or Company		CABINET ORES	
No. of permanent power of attorney and/or contractual arrangement			
Address	Street	36, rue de Saint-Pétersbourg	
	Postcode and town	[7 5 0 0 8] PARIS	
	Country		
Telephone No. (optional)		01.53.21.11.00	
Fax No. (optional)		01.53.2108.88	
E-mail address (optional)		ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTOR(S)</b>			
The inventors must be natural persons			
The inventors are the applicants		<input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No In this case, fill in the Designation of inventor(s) form	
<b>8 SEARCH REPORT</b>			
For a patent application only (including division and conversion)			
Immediate compilation or deferred compilation		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Fee paid in instalments (in two instalments)		Only for natural persons filing their own application <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
<b>9 REDUCTION OF FEES</b>			
For natural persons only <input type="checkbox"/> Requested for the first time for this invention (attach notice on non-application) <input type="checkbox"/> Obtained prior to filing for this invention (attach copy of the decision granting free assistance or indicate its reference): AG [ ]			
<b>10 NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID SEQUENCE</b>			
The computer readable form is enclosed		<input checked="" type="checkbox"/>	
The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing is enclosed		<input checked="" type="checkbox"/>	
If you used the "continuation" form, give the number of attached pages		1	
<b>11 SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE</b> (name and capacity of the signatory)  [signature]  VIALLE-PRESLES Marie José (no. 93-2009)			<b>SIGNED FOR THE PREFECTURE OR THE INPI</b>  M. MARTIN



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04 Fax: 33 (1) 42 94 86 54

1st filing

**PATENT**  
**UTILITY CERTIFICATE**  
Intellectual Property Code - Book VI



**REQUEST FOR GRANT**

Continuation page No. 1 / 1



SUBMISSION OF DOCUMENTS	
DATE	13 JAN. 2004
PLACE	75 INPI PARIS 34 SP
NATIONAL REGISTRATION No.	04/00,260
ASSIGNED BY THE INPI	

Reserved for the INPI

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 829 @ W / 010702

<b>Your file references: (optional)</b>		MJPbv539/120	
<b>4</b> PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR FRENCH APPLICATION	Country or organisation	No.	
	Date		
	Country or organisation	No.	
	Date		
	Country or organisation	No.	
	Date		
<b>5</b> APPLICANT: (Tick one of the 2 boxes)		<input checked="" type="checkbox"/> Legal entity	<input type="checkbox"/> Natural person
Name or company name		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Forenames			
Legal form		Public Establishment	
SIREN No.			
APE-NAF Code			
Domicile or registered office	Street	3, rue Michel-Ange	
	Postcode and town	75 016 PARIS	
	Country		
Nationality			
Telephone No. (optional)			
Fax No. (optional)			
E-mail address (optional)			
<b>5</b> APPLICANT: (Tick one of the 2 boxes)		<input type="checkbox"/> Legal entity	<input checked="" type="checkbox"/> Natural person
Name or company name		UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS	
Forenames			
Legal form		Public Establishment	
SIREN No.			
APE-NF Code			
Domicile or registered office	Street	3, rue des Tanneurs	
	Postcode and town	37 041 TOURS CEDEX 1	
	Country		
Nationality			
Telephone No. (optional)			
Fax No. (optional)			
E-mail address (optional)			
<b>11</b> SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE		SIGNED FOR THE PREFECTURE OR THE INPI	
(name and capacity of the signatory) VIALLE-PRESLES Marie José (no. 93-2009)		M. MARTIN	

1st Filing

The present invention relates to attenuated mutant strains of Apicomplexa of the family Sarcocystidae, such as *Toxoplasma* and *Neospora*, and to the uses thereof for vaccines.

5

The Apicomplex phylum (branch Apicomplexa) groups together a large number of predominantly intracellular parasites. These parasites are responsible for diseases such as toxoplasmosis, malaria, neosporosis, 10 coccidiosis and cryptosporidiosis. They have in common a specific process of host cell invasion in several steps, resulting in the formation of a parasitophorous vacuole in which the parasite develops (Menard et al., Cell Microbiol. 3: 63-73, 2001; Soldati et al., Int. J. 15 Parasitol. 31: 1293-1302, 2001).

*Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular protozoan parasite responsible for human and animal toxoplasmosis. It belongs to the family Sarcocystidae, 20 which also groups together other major pathogens of humans and of animals, such as *Neospora* or *Sarcocystis* (Levine, The Protozoan Phylum Apicomplexa. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 203, 1988; Tenter et al., Int. J. Parasitol. 32(5): 595-616, 2002). Its life 25 cycle has two distinct aspects: an "asexual" cycle in an intermediate host, such as humans, mice, ovine species and porcine species, resulting in the production of tachyzoites and then of cysts containing bradyzoites; and a "sexual" cycle in cats, resulting in 30 the production of oocysts (containing sporozoites) eliminated in the feces.

Animal toxoplasmosis poses a considerable economic problem in the field of agricultural rearing. It 35 affects all productive animals. Transmission to these animals takes place via the ingestion of oocysts, forms of resistance emitted into the environment by cats infected with a pathogenic toxoplasma. In ovine



species, caprine species and porcine species infected during gestation, it causes abortions. In the European Union, the ovine population of which is estimated at 100 million heads, 1 million lambs are lost each year because of abortions due to toxoplasma.

Moreover, the consumption of meat (especially mutton and pork) infected with the presence of bradyzoites is the main source of human infections. When contracted during pregnancy, toxoplasmosis is the 2nd most common cause of congenital malformations. In addition, over the last twenty years, this parasite has emerged as an opportunistic pathogen, responsible for encephalitis in AIDS patients.

The development of vaccines conferring protection against *Apicomplexa* parasitoses is the subject of numerous research studies. Two main strategies are employed: 1) the identification of parasitic antigens capable of inducing a protective immune response, and the incorporation of these antigens into vaccine compositions; 2) the selection of attenuated parasite strains. For example, in the case of toxoplasmosis, it has been proposed to use various attenuated strains of *Toxoplasma gondii* (patent US 5,045,313; patent US 4,473,549; patent application US 2002/0164754; patent application GB 2 204 323) for conferring anti-toxoplasma immunity on mammals.

The key steps in *Apicomplexa* infection, and in particular infection with *Toxoplasma gondii*, are the attachment of the parasite to the host cells, followed by invasion of the latter. The invasive apparatus of the *Apicomplexa* involves the sequential exocytosis of two types of secretory organelles: micronemes and rhoptries.

Recent studies have demonstrated the central role of micronemes in the recognition of host cells, and the adhesion to the latter. The microneme proteins, referred to under the generic name "MICs" contain  
5 modules homologous to the adhesion domains of higher eukaryotic proteins (Tomley and Soldati, Trends Parasitol. 17: 81-88, 2001).

A dozen or so MIC proteins are currently known in  
10 *Toxoplasma gondii* (Soldati et al., Int. J. Parasitol. 31: 1293-1302, 2001). Some of them are transmembrane proteins, for example MIC2 of *Toxoplasma gondii*, called TRAP in *Plasmodium* (Matuschewski et al., EMBO J. 21: 1597-1606, 2002); the others are soluble proteins which  
15 are targeted to the micronemes and redistributed at the surface of the parasite during invasion, in combination with the transmembrane proteins.

Recently, two soluble proteins, MIC1 and MIC3, capable  
20 of binding to the surface of host cells, have been characterized in *T. gondii* (Achbarou et al., Mol. Biochem. Parasitol., 47, 223-233, 1991; Fourmaux et al., Mol. Biochem. Parasitol. 83: 201-210, 1996; Garcia-Reguet et al., Cell. Microbiol. 2: 353-364,  
25 2002).

The MIC1 protein contains a tandem duplicated domain which has a distant homology with the TSP-1-type domain of TRAP, and exhibits a lactose-binding specificity  
30 (Lourenco et al., Glycobiol. 11: 541-547, 2001).

The MIC3 protein is a dimer with an apparent molecular weight of 90 kDa, formed from two subunits of 38 kDa connected by disulfide bridges. MIC3 contains five EGF-  
35 type domains, two of which are overlapping, and a domain of "chitin-binding domain" type, rich in disulfide bridges, and which appears to be necessary

for binding to the surface of the host cell (Garcia-Reguet et al., 2000, mentioned above; Cerede et al., EMBO J. 21: 2526-2536, 2002).

5 MIC1 and MIC3 associate with other MIC proteins so as to form two independent complexes, MIC1/4/6 and MIC3/8. The transmembrane proteins MIC6 and MIC8 play the role of transporters for targeting respectively the MIC1/4 and MIC3 proteins to the micronemes. The MIC1 protein  
10 is essential for the MIC1/4/6 complex to be able to leave the early compartments of the secretion pathway (Reiss et al., J. Cell Biol. 152: 563-578, 2001).

It has recently been shown that the MIC3 protein of  
15 *Toxoplasma gondii* constitutes a major vaccine antigen which gives rise to an early and very strong humoral immune response (PCT application WO 01/64243).

With the aim of studying the role of MIC1 and MIC3 in  
20 the invasive capacity and the virulence of *Toxoplasma gondii*, the inventors have constructed mutant strains of *T. gondii*, in which one and/or the other of the adhesins MIC1 and MIC3 has/have been inactivated.

25 They have noted that the inactivation of MIC1 decreases by approximately 50% the invasive capacity with respect to fibroblasts *in vitro*, whereas the inactivation of MIC3 does not modify this invasive capacity; the simultaneous inactivation of the two proteins does not  
30 significantly modify the invasive capacity compared with the inactivation of MIC1 alone. The virulence *in vivo* is only very slightly affected by the isolated inactivation of MIC1 and MIC3; on the other hand, it is greatly decreased by the simultaneous inactivation of  
35 the two proteins.

The inventors have also noted that, despite the absence of the major antigens constituted by MIC1 and MIC3, a double mutant strain of *Toxoplasma gondii* in which these two proteins are inactivated makes it possible to  
5 obtain an effective vaccine protection with respect to toxoplasmosis.

They have subsequently undertaken to study the infectious and protective characteristics of said  
10 strain on animals, in particular on mice and ewes.

They have thus demonstrated that vaccination with this strain protects the animals against the formation of brain cysts when there is a re-infection with a  
15 pathogenic wild-type strain of *Toxoplasma gondii*, which considerably decreases the scope of an infection with this pathogenic wild-type strain, the risk of transplacental passage in the case of gestating females, and the possibility of transmission by  
20 consumption of meat of the immunized animals, and therefore, in the end, makes it possible to bring down the general prevalence of the infection.

A subject of the present invention is therefore a  
25 mutant strain of an Apicomplex of the family *Sarcocystidae*, comprising a mutation which inactivates the adhesin MIC1 and a mutation which inactivates the adhesin MIC3.

30 According to a preferred embodiment of the present invention, said *Sarcocystidae* is chosen from *Toxoplasma* and *Neospora*.

According to a preferred arrangement of this  
35 embodiment, said mutant strain is a strain of toxoplasma, in particular of *Toxoplasma gondii*.

Herein, the expression:

- "mutation which inactivates the adhesin MIC1" is intended to mean any mutation resulting in the absence of expression of MIC1, or in the expression of a nonfunctional MIC1 protein, i.e. incapable of forming a complex with the MIC4 and MIC6 proteins, or incapable of binding lactose; and
- "mutation which inactivates the adhesin MIC3" is intended to mean any mutation resulting in the absence of expression of MIC3, or in the expression of a nonfunctional MIC3 protein, i.e. having lost its function of binding to the surface of a host cell.

15

Examples of mutations resulting in the absence of expression of MIC1 or MIC3 are in particular the deletion of the entire corresponding gene, or of its coding region, or of its promoter region. Examples of mutations resulting in the expression of a nonfunctional MIC3 protein are in particular mutations affecting the region of the *mic3* gene encoding the domain of type: "chitin-binding domain of the MIC3 protein", i.e. amino acids 84-144 of said protein. They can in particular be mutations affecting at least the tryptophan at position 126 or the phenylalanine at position 128 of the MIC3 protein.

These mutations can be made conventionally by insertion, deletion or substitution of one or more bases in the targeted sequence.

By way of nonlimiting examples of mutagenesis and transformation techniques which can be used in toxoplasmas, mention will in particular be made of those described in the following publications: Kim et al., (Science 262: 911-914, 1993); Donald and Roos,

(Mol. Biochem. Parasitol. 63: 243-253, 1994); Soldati et al., (Mol. Biochem. Parasitol. 74: 87-97, 1995); Donald and Roos, (Mol. Biochem. Parasitol. 91: 295-305, 1998).

5

A subject of the present invention is also the use of a mutant strain of *Apicomplexa*, and in particular of toxoplasma, in accordance with the invention, for obtaining a vaccine intended to confer protective immunity against an *Apicomplexa* parasitosis, in particular against toxoplasmosis.

15 A subject of the present invention is also a vaccine, characterized in that it comprises, as active ingredient, a mutant strain of *Apicomplexa*, and in particular of toxoplasma, in accordance with the invention, as defined above.

20 The present invention will be understood more clearly from the further description which follows, which refers to examples of construction of *Toxoplasma gondii* mutants in which MIC1 and/or MIC3 are inactivated, and of use, for a vaccine, of a double mutant in which MIC1 and MIC3 are inactivated.

25

It should be clearly understood, however, that these examples are given only by way of illustration of the subject of the invention, for which they in no way constitute a limitation.

30

**EXAMPLE 1: INACTIVATION OF MIC1 AND/OR MIC3 IN  
*T. GONDII***

**Plasmids used:**

5

The plasmids pmic3KO-1 and pmic3KO-2 were used, respectively, to construct the single mutant mic3KO from the RHhxgprt<sup>-</sup> strain and the double mutant mic1-3KO from the mic1KO strain. The plasmids pM3MIC3ty and pM2MIC1myc + pM3MIC3 were used, respectively, to restore the expression of MIC3 in the mic3KO mutant (strain mic3KO+MIC3), and to restore the expression of MIC1 and MIC3 in the double mutant mic1-3KO (strain mic1-3KO+MIC1-3).

15

**Plasmid pmic3KO-1**

The 3'UTR region of the *Mic3* gene (2136 bp) was amplified by PCR from the plasmid pBlueMIC3 (Cerede et al., 2002, mentioned above), which results from the insertion of a genomic DNA fragment of 2247 bp (GenBank AJ132530) of *T. gondii* at the NotI site of the plasmid pBluescript II® SK(-).

25 For the amplification, the primers ML9: 5'-GTGTAAGCTTCAGCGAGTCTCTGAGAG-3' (SEQ ID NO: 1) and ML10: 5'-GGGGTACCGAGCTCATGAGCAGAAGCTGCCAG-3' (SEQ ID NO: 2) were used. The amplified region was cloned between the HindIII and KpnI restriction sites of the plasmid pminiHXGPRT (Donald and Roos, 1998, mentioned above). A DNA fragment of 1977 bp of the 5'UTR region of *Mic3* was obtained by XbaI/NheI digestion of an EcoRI fragment of 3.5 kb of the 5' genomic sequence of *Mic3*, and cloned into the XbaI site of pminiHXGPRT.

35

The resulting plasmid, which contains the HXGPRT (hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase)

selection marker, bordered by the regions flanking, in the 3' position and 5' position, the ORF of *mic3*, was called pmic3KO-1.

5 Plasmid pmic3KO-2

The 3'UTR and 5'UTR regions of *mic3*, obtained as described above, were inserted into the plasmid pTUB/CAT (Kim et al., 1993, mentioned above), on either  
10 side of the sequence encoding the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) selection marker, at the same restriction sites as those described for the plasmid pmniHXGPRT.

15 The resulting plasmid, containing the CAT selection marker, bordered by the regions flanking, in the 3' position and 5' position, the ORF of *mic3*, was called pmic3KO-2.

20 Plasmid pM3MIC3ty

This plasmid was constructed from the plasmid pT8GFPPfmyoAtail (Hetmann et al., Mol. Biol. Cell 11: 1385-1400, 2000), in which a TY epitope (Bastin et al.,  
25 Mol. Biochem. Parasitol. 77(2): 235-239, 1996) has been added between the NsiI and PacI sites. This plasmid contains the tubulin promoter between the KpnI and EcoRI sites of the gene encoding GFP, bordered by the EcoRI and NsiI sites.

30

The *Mic3* promoter region (562 bp) was amplified by PCR from the plasmid pBlueMIC3 with the primers ML23: 5'-CTGAATTCAGATCTTACCAGTGTGGACAAGG-3' (SEQ ID NO: 3) and ML24: 5'-GGGGTACCCCTTGCTAGGTAACCACTCGTGC-3' (SEQ ID  
35 NO: 4), and inserted in place of the tubulin promoter at the KpnI and EcoRI sites.



The primer ML24 makes it possible to introduce a BglII restriction site upstream of the EcoRI site and to then clone the *Mic3* gene in place of the gene encoding GFP at the BglII and NsiI sites.

5

The sequence encoding MIC3 was amplified by PCR from the plasmid pBlueMIC3 with the primers

ML11: 5'-GCACAATTGAGATCTAAAATGCGAGGCGGGACGTCC-3'

(SEQ ID NO: 5) and

10 ML15: 5'-TGCTATGCATTCTAGGCTGCTTAATTTTCTCACACGTAC-3'

(SEQ ID NO: 6) introducing, respectively, the BglII and NsiI restriction sites.

#### Plasmids pM2MIC1myc and pM3MIC3

15

The plasmid pM2MIC1myc (Reiss et al., J. Cell Biol. 152: 563-578, 2001) expresses the MIC1 protein, tagged with the myc epitope at its C-terminal end, under the control of the sequences flanking, in the 5' position and 3' position, the *Mic2* gene.

20

The plasmid pM3MIC3 was constructed by cloning a PvuI/SacI fragment of 2072 bp of the vector pBlueMIC3, containing the *Mic3* gene and its 5' and 3' flanking regions, between the SacI and PacI sites of the vector pT/230-TUB5/BLE (Soldati et al., Mol. Biochem. Parasitol. 74: 87-97, 1995) containing an expression cassette expressing the phleomycin selection marker.

25

#### 30 Construction of the mutant strains mic3KO and mic1-3KO, and of the complemented mutant strains mic3KO+MIC3 and mic1-3KO+MIC1-3

The haploidy of the Apicomplex genome during the proliferative phase makes it possible to knock out the *Mic3* gene in a single homologous recombination.

35

All the *T. gondii* used were produced in human fibroblasts (HFFs) cultured in Dulbecco's minimal medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 50 U/ml of penicillin and  
5 50 µg/ml of streptomycin. They were harvested during lysis of the host cells.

#### Strain mic3KO

10

The *T. gondii* strain used for the mutagenesis is the RHxgprt<sup>-</sup> strain (Donald and Roos, 1998, mentioned above), deficient for the hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HXGPRT) gene, and as a  
15 result, sensitive to mycophenolic acid.

80-100 µg of plasmid pmic3KO-1 purified and then linearized with KpnI were added to 10<sup>7</sup> RHxgprt<sup>-</sup> tachyzoites suspended in Cytomix electroporation medium  
20 (van den Hoff et al., Nucleic Acids Res. 20: 2902, 1992), and the electroporation was carried out in a 4 mm-gap cuvette, in a volume of 800 µl, on a BTX Electrocell Manipulator device (parameters: 2 kV, R = 48 ohms).

25

After electroporation, the tachyzoites were deposited onto a monolayer of HFF cells in culture. For selection of the mutants, the day after the electroporation, the culture medium was supplemented with the selection  
30 agent (25 µg/ml of mycophenolic acid and 50 µg/ml of xanthine) and three passages in culture were carried out in this medium.

Five days after the final passage, the parasites are  
35 cloned by limiting dilution, in the wells of a 96-well plate, of HFF cells, in the presence of selection agent, and the clones selected are amplified.

**Strain mic1-3KO**

The *T. gondii* strain used for the mutagenesis is the mic1KO strain (Reiss et al., J. Cell Biol. 152: 563-578, 2001), which derives from the RHxgprt<sup>-</sup> strain described above, by deletion of the *Mic1* gene, replaced with the gene encoding HXGPRT in the mic1KO strain.

80-100  $\mu$ g of plasmid pmic3KO-2 purified and then linearized with KpnI were added to  $10^7$  mic1KO tachyzoites for an electroporation under the conditions described above.

The mutants were selected and cloned as described above, in the presence of 20  $\mu$ M of chloramphenicol as selection agent.

The mutants in which MIC3 was inactivated are called mic3KO, and those in which MIC1 and MIC3 were inactivated are called mic1-3KO.

**Strain mic3KO+MIC3**

The expression of MIC3 was restored by cotransfection of the mic3KO parasites with 100  $\mu$ g of the vector pM3MIC3ty, and 10  $\mu$ g of the plasmid pTUB/CAT.

The selection was carried out in the presence of 20  $\mu$ M of chloramphenicol as described above.

The mic3KO strain complemented with MIC3 is called mic3KO+MIC3.

**Strain mic1-3KO+MIC1-3**

The expression of MIC1 and MIC3 was restored by cotransfection of the mic1-3KO parasites with 100  $\mu$ g of

the vector pM2MIC1myc, and 10  $\mu$ g of the plasmid pM3MIC3.

5 The mutants were selected and cloned as described above, in the presence of 10  $\mu$ g/ml of phleomycin as selection agent.

The mic1-3KO strain complemented with MIC1 and MIC3 is called mic1-3KO+MIC1-3.

10

The total proteins of the mutants mic3KO, mic1-3KO, mic3KO+MIC3, and mic1-3KO+MIC1-3 were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting. After extraction of the total proteins by boiling of the cells in SDS buffer (in the absence or presence of 0.1M DTT) and separation on 10% polyacrylamide gels, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. The Western blots were labeled as described by Garcia-Reguet et al. (1998, mentioned above) using anti-MIC3 (T42F3 at 1:400) and anti-MIC1 (T101F7) monoclonal antibodies and then detected with goat anti-mouse IgGs conjugated to alkaline phosphatase (1:1000).

15

20

The results are presented in figure 1.

25

Legend of figure 1:

1 = wild-type strain of *Toxoplasma gondii* RH

2 = mutant mic3KO

3 = mutant mic3KO+MIC3

30

4 = mutant mic1KO (Reiss et al., 2001)

5 = mutant mic1KO+MIC1 (Reiss et al., 2001)

6 = mutant mic1-3KO

7 = mutant mic1-3KO+MIC1-3

35

The results show that the expression of MIC3 is undetectable in mic3KO (2) and mic1-3KO (6), but is restored in mic3KO+MIC3 (3) and mic1-3KO+MIC1-3 (7).

The expression of MIC1 is undetectable in mic1KO (4) and mic1-3KO (6), but is restored in mic1KO+MIC1 (5) and mic1-3KO+MIC1-3 (7).

5 These results were confirmed by immunofluorescence. The tachyzoites cultured overnight on a monolayer of HFF cells were washed in PBS and fixed with 4% formaldehyde for 20 min. After 3 washes, the infected HFF cells were permeabilized with 0.1% of Triton X-100 in PBS for  
10 10 min, the reaction was stopped with 10% of fetal bovine serum (FBS) for 30 min, and the cells were then incubated with the primary antibody (anti-MIC1 mAb T101F7, anti-MIC3 mAb T42F3) diluted in 2% FBS, for 40 min, washed, and then incubated with a secondary  
15 antibody (goat anti-mouse coupled to FITC, and Texas red goat anti-rabbit). The observations were made under a Leica DMRA2 microscope equipped for epifluorescence and the images were recorded with a Princeton coolSNAP  
20 CCD camera.

The results show that no MIC3 protein is detectable in mic3KO tachyzoites, whereas an expression of wild-type MIC3 is observed in the micronemes of the complemented strains (mic3KO+MIC3, mic1-3KO+MIC1-3). The  
25 complementation of MIC1 in mic1KO+MIC1 and mic1-3KO+MIC1-3 results in a certain accumulation of MIC1 in the parasitophorous vacuole and in the perinuclear space.

30 **EXAMPLE 2: EFFECTS OF THE INACTIVATION OF MIC1 AND/OR MIC3 ON THE INFECTIOUS PROPERTIES OF *T. GONDII***

The *Toxoplasma gondii* mutants described in example 1 above were maintained by regular passages on HFF cells  
35 cultured in DMEM medium supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 50 U/ml of penicillin and 50 µg/ml of streptomycin.

**Invasive capacity**

2 × 10<sup>5</sup> purified mic1KO, mic1KO+MIC1, mic3KO and mic1-3KO tachyzoites were added to HFF cells cultured on glass coverslips. The cells were fixed for 12 h and then stained using a methylene blue-eosin mixture (RAL 555 kit), and mounted under coverslips, permanently (Pertex, Microm, France). The number of parasitic vacuoles, representing the invasive capacity of the parasite, was counted in 10 randomly selected fields per coverslip, and the data were presented as the mean of vacuoles per field originating from 4 coverslips, on the basis of 5 independent repetitions.

The control was carried out under the same conditions with the RHxgprt<sup>-</sup> strain, the invasive capacity of which is comparable to that of the wild-type RH strain of *Toxoplasma gondii*.

The results are presented in figure 2 (\*\*\*) = significantly less invasion,  $p < 0.001$ ).

The results show that the invasive capacity of the mic1KO parasites is decreased by approximately 50% compared with that of the control strain RHxgprt<sup>-</sup>.

On the other hand, the invasive capacity of the mic3KO parasites and of those of the control strain is comparable (figure 2A). The invasive capacity of the mic1-3KO parasites is not significantly different from that of the mic1KO mutants (figure 2A), indicating that MIC1 and MIC3 do not have an additive function in the invasion of fibroblasts by *Toxoplasma gondii*.

The complementation of mic1KO by MIC1 restores the invasive capacity to a level comparable to that of the control strain (figure 2B).

### Virulence

5 The mice generally die 9 days after an intraperitoneal infection with 20 tachyzoites of the wild-type strain RH of *Toxoplasma gondii*.

10 The study of the virulence of the mic1KO, mic3KO, mic1-3KO, mic1KO+MIC1, mic3KO+MIC3 and mic1-3KO+MIC1-3 mutants was carried out on a batch of 10 male OF1 mice, by intraperitoneal injection of 20 tachyzoites/mouse of the mic1-3KO strain, and by following the outcome regarding the infected mice.

15 The controls were carried out under the same conditions on a batch of 9 male OF1 mice, using the RHhxxgprt<sup>-</sup> strain, the virulence of which is comparable to that of the wild-type strain RH of *Toxoplasma gondii*.

20 The results are represented in figure 3.

Legend of figures 3A, 3B and 3C:

- 25 ♦ = strain mic1KO (A); strain mic3KO (B); strain mic1-3KO (C),  
■ = strain mic1KO+MIC1 (A); strain mic3KO+MIC3; strain mic1-3KO+MIC1-3 (C),  
Δ = strain RHhxxgprt<sup>-</sup> (A, B and C).

30 All the mice infected with the RHhxxgprt<sup>-</sup> strain died 9 days after the infection. The mice infected with mic1KO or mic3KO exhibit a slight delay in mortality (death of the mice between 9 and 22 days after infection), which is not observed in the case of the mice infected with the complemented mutants mic1KO+MIC1  
35 and mic3KO+MIC3. Just one of the mice infected with mic3KO remained alive 44 days after infection, and this animal developed a *T. gondii*-specific antibody response

(results not shown). These results indicate that the isolated inactivation of the *Mic1* or *Mic3* gene results in only a slight decrease in virulence in the mice.

5 On the other hand, in the case of the mice infected with the *mic1*-3KO strain, a virtually complete survival (90% survival 40 days after infection) is observed. The complementation of *mic1*-3KO with MIC1 and MIC3 (strain *mic1*-3KO+MIC1-3) completely restores the virulence of  
10 the parasites.

The mice were also infected with various amounts of the double mutant *mic1*-3KO and the lethal dose (LD100) of *mic1*-3KO was compared with that of the control strain  
15 RHxgprt<sup>-</sup>. While the LD100 at 9 days of the control strain is less than 20 tachyzoites, that of the *mic1*-3KO strain is of the order of  $2 \times 10^3$  tachyzoites.

20 **EXAMPLE 3: INVOLVEMENT OF THE ADHESION FUNCTION OF MIC3  
IN THE VIRULENCE OF TOXOPLASMA GONDII**

**Determination of residues involved in the adhesion  
function of MIC3**

25 It has been shown (Cerede et al., 2002, mentioned above) that the "chitin-binding-type domain" of MIC3 is essential for binding to the surface of the host cell.

Various mutations were introduced into this domain, in  
30 order to determine the residues essential to the functionality of MIC3.

The mutations made are as follows:

- 35 - substitution of one of the cysteine residues at positions 102 (mutant C102G), 107 (mutant C107G) and 108 (mutant C108G), with a glycine residue;



- substitution of the proline residue at position 103 with an alanine residue (mutant P103A);
- substitution of one of the serine residues at positions 109 (mutant S109A) and 130 (mutant S130A) with an alanine residue;
- substitution of one of the tyrosine residues at positions 96 (mutant Y96A), 135 (mutant Y135A) and 141 (mutant Y141A), with an alanine residue;
- substitution of one of the phenylalanine residues at positions 97 (mutant F97A), 121 (mutant F121A) and 128 (mutant F128A), with an alanine residue;
- substitution of the tryptophan residue at position 126 with an alanine residue (mutant W126A).

15 The positions of the mutations are indicated with reference to the polypeptide sequence of the precursor of MIC3 (Genbank CAB56644).

20 The mutations were created by site-directed mutagenesis by PCR (Quickchange®, Stratagene) of the sequence encoding the mature form of MIC3, contained in the plasmid pOC2 (Cerede et al., 2002, mentioned above).

25 The plasmids obtained are respectively called pC102 (mutant C102G), pC107 (mutant C107G), pC108 (mutant C108G), pP103 (mutant P103A), pS109 (mutant S109A), pS130 (mutant S130A), pY96 (mutant Y96A), pF97 (mutant F97A), pF121 (mutant F121A), pW126 (mutant W126A), pF128 (mutant F128A), pY135 (mutant Y135A), and pY141 (mutant Y141A).

30 The plasmids were purified using the Qiagen kit® (Qiagen), and the presence of the expected mutations was verified by sequencing.

35 The mutant MIC3 proteins were expressed by transfection of BHK-21 cells (Baby Hamster Kidney, ATCC CCL-10)

cultured in BHK-21 medium (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 2 mM of tryptose, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin.

5 For each plasmid,  $3 \times 10^5$  BHK-21 cells, cultured beforehand on coverslips for 24 h in 24-well plates, were transfected with the purified plasmid, using Lipofectamine®, according to the conditions recommended by the manufacturer (Gibco-BRL). The cells were  
10 cultured for a further 24 h before analysis.

The binding properties of the mutant MIC3 proteins were studied by analyzing their localization in the transfected BHK-21 cells. The transfected BHK-21 cells  
15 were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 15 min, and then washed and permeabilized with 0.1% of Triton X-100 in PBS for 10 min. The coverslips bearing the cells were then washed in PBS containing 0.5% of BSA, and incubated for 1 h in the same buffer containing an  
20 anti-MIC3 antibody (T82C10, 1:200) or anti-V5 antibody (1:500), and then for 1 h with a goat IgG conjugated to TRITC (Sigma, 1:400), with several washes in PBS between each incubation. The coverslips were then washed and mounted on microscope slides. The  
25 visualization was carried out using an epifluorescence microscope.

Four categories of mutants were defined according to their localization.

30

In the first category (mutants C102G, C107G, C108G, Y141A, F121A), the protein is retained in the secretory system; in the second category (Y135A, Y96A, F97A, S109A, P103A), the protein is secreted normally and  
35 binds to the surface of the transfected cells, as does the mature wild-type MIC3 protein; in the third category (W126A, Y128A), the protein is secreted

normally but does not bind to the surface of the transfected cells; in the fourth category (S130A), the protein is secreted normally and binds to a network of cellular material deposited by the cells at the surface of the glass plates.

These results show that all the mutations affecting a cysteine residue result in a major secretion deficiency; the corresponding mutant MIC3 proteins accumulate in the form of large perinuclear vesicles, indicating that these proteins are incorrectly folded or incompletely assembled. This result is coherent with the role of cysteines in the folding of the domain.

As regards the other substitutions, the two mutations F121A and Y141A also affect the leaving of the proteins. The other mutants (Y135A, Y96A, F97A, S109A, P103A, W126A, F128A, S130A) are all expressed in dimer form and secreted. Two of them (W126A, Y128A) do not bind to the transfected BHK-21 cells. Due to the loss of these binding properties, these two mutants are abundantly secreted into the supernatant. In the case of the S130A mutant, the labeling with the anti-MIC3 antibodies is not associated with the plasma membrane of the transfected cell, as in the case of the wild-type MIC3 protein, but with the intercellular space, as if the R-MIC3 S130A protein was bound to the cellular material deposited onto the plates.

These results show that the two aromatic residues W126 and Y128 are involved in the interaction with the receptor of the host cell's surface, and that the residue S130 could also contribute to the binding properties of MIC3 by participating in the specificity of interaction.

Involvement of the residues W126 and Y128 in the virulence of *T. gondii*

5 To study the role of the adhesion function of MIC3 in the virulence of *T. gondii*, experiments consisting of complementation of the double mutant strain mic1-3KO with the mutants W126A and F128A were carried out.

10 The plasmids pM3MIC3W126A, pM3MIC3F128A and pM3MIC3Y135A were constructed from the plasmid pM3MIC3. These plasmids bear the phleomycin selection gene, and express the mutants W126A, F128A and Y135A, respectively. The presence of the expected mutations was verified by sequencing.

15

The mic1-3KO strain was transfected with the plasmid pM3MIC3W126A (strain mic1-3KO+MIC3W126A) or pM3MIC3F128A (strain mic1-3KO+MIC3F128A). The strain mic1-3KO+MIC3 and the strain mic1-3KO transfected with 20 the plasmid pM3MIC3Y135A (mic1-3KO+MIC3Y135A) were used as positive binding controls.

25 The expression of the MIC3 proteins in the various strains was analyzed by Western blotting, and their binding properties were analyzed by cell blotting. The cell blotting was carried out with a duplicate of the nitrocellulose sheet used for the Western blotting, incubated with a suspension of Mode-K cells (Vidal et al., J. Immunol. Methods 166: 63-73, 1993) cultured in 30 RPMI medium (Bio Whittaker) supplemented with 5% of fetal calf serum (FCS), 25 mM of Hepes, 2 mM of glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin.

35 The results are presented in figures 4A (Western blotting) and 4B (cell blotting).

Legend of figures 4A and 4B:

- 1 = wild-type strain of *Toxoplasma gondii* RH
- 2 = strain mic1-3KO+MIC3
- 3 = strain mic1-3KO+MIC3W126A
- 5 4 = strain mic1-3KO+MIC3F128A
- 5 = strain mic1-3KO+MIC3Y135A

The results of the Western blotting show the expression of MIC3 proteins in all the strains. All these proteins migrate at the size expected for a dimer under reducing conditions. However, the W126A and Y135A proteins migrated faster than the others, which suggests a conformational modification.

The results of the cell blotting show that, as expected, the cells bind strongly to native MIC3 (1), MIC3myc (2) and to MIC3 Y135A (5). On the other hand, the cells are incapable of binding to MIC3 W126A (3) and MIC3 F128A (4). Furthermore, the conformational modification of MIC3 Y135A does not affect its binding properties.

The strains mic1-3KO+MIC3W126A, mic1-3KO+MIC3F128A and, as a control, mic1-3KO+MIC3Y135A were used to analyze the involvement of the adhesion function of MIC3 in the virulence in mice.

Analysis of the virulence of the strains

The virulence test was carried out as described in example 2: 20 tachyzoites of each parasite were injected intraperitoneally into male OF1 mice (batch of 11 to 20 mice), the survival of which was followed for 40 days. The results are presented in figure 5.

35

Legend of figure 5:

- ♦ = strain mic1-3KO

- 5       ■ = strain mic1KO  
          Δ = strain mic1-3KO+MIC3  
          o = strain mic1-3KO+MIC3Y135A  
          + = strain mic1-3KO+MIC3F128A  
          x = strain mic1-3KO+MIC3W126A.

As expected, the mice infected with mic1-3KO+MIC3 behave in the same way as the mice infected with mic1KO, and die according to similar kinetics in 9-26  
10 days. The survival of the mice infected with the strain mic1-3KO+MIC3Y135A is greater (which may be due to a partially defective targeting of the MIC3 Y135A protein into the parasitophorus vacuoles).

15 On the other hand, a survival of respectively 83.3% and 95% of the mice infected with the strain mic1-3KO+MIC3W126A and mic1-3KO+MIC3F128A is observed 40 days after infection.

20 These results show that the host-cell-binding function of MIC3 is essential for the virulence of the parasite.

**EXAMPLE 4: PROTECTIVE CHARACTERISTICS OF THE mic1-3KO  
MUTANT**

25 Experiments consisting of vaccination against *Toxoplasma gondii* by means of the mic1-3KO mutant were carried out on mice and ewes.

30 I- In mice

**Experimental protocol**

Batches of 9.5-week old male OF1 mice were treated as  
35 follows:

- 21 mice (batch 1) received the mic1-3KO mutant;

- 21 mice (batch 2) received the *mic1-3KO* mutant and were then reinfected approximately 1 month later with the cystogenic *Toxoplasma gondii* strain 76K;
- 5        - 10 mice (batch 3) were infected with the cystogenic *Toxoplasma gondii* strain 76K at the time of the reinfection of batch 2.

At D0, the mice of batches 1 and 2 received 20  
10 tachyzoites of the *mic1-3KO* mutant intraperitoneally.

At D14, the infection of the mice was verified by searching for the presence of anti-*Toxoplasma gondii* IgGs, using total extract of toxoplasma (strain RH).

15

At D37, the mice effectively immunized (presence of anti-toxoplasma IgGs) of batch 2 (8 mice) and of batch 3 (8 mice) were fed by gavage with 70 cysts of the *Toxoplasma gondii* strain 76K.

20

At D61, the mice of the three batches were sacrificed. The presence of anti-MIC3 IgG, due to the infection with *Toxoplasma gondii* 76K (since the *mic1-3KO* vaccine strain does not express this protein), was sought and  
25 the brain cysts were counted in the ground brain material from these mice (counting on a Malassez cell; detection limit is 30 cysts per brain).

Eight 15-week-old naïve OF1 male mice were fed by  
30 gavage with 1/3 of the brain from each of the 8 mice of batch 2 (control for the absence of brain parasites). A control mouse received 60 cysts of the *Toxoplasma gondii* strain 76K derived from a mouse of batch 3 (positive control).

35

At D82, the presence of anti-MIC3 IgGs was sought in the mice fed by gavage at D61.

At D103, the mice were sacrificed and the brain cysts were counted.

## 5 Results

### At D14

Out of the 42 mice of batches 1 and 2, 8 died around  
10 D10, during the acute phase of infection (which reflects the high sensitivity of the mice to the residual virulence of the MIC1-3KO mutant). The verification of infection by detection of IgGs directed against the parasitic antigens shows that 16 mice are  
15 negative and therefore uninfected. Batches 1 and 2 are therefore reduced to 10 and 8 mice, respectively.

### At D61

#### 20 *Search for anti-MIC3 IgGs*

No anti-MIC3 IgG was detected in the serum of the mice of batch 1 (negative control), whereas the presence of anti-MIC3 IgG was detected in the serum of the mice of  
25 batch 3 (positive control). The presence of anti-MIC3 IgG was detected in the serum of the mice of batch 2, with the exception of one mouse, which exhibits a very weak response.

#### 30 *Counting of brain cysts*

Upon microscopic examination, the brains of the mice of batch 1 do not contain any brain cysts (negative control), whereas brains from the mice of batch 3  
35 contain from 2250 to 7250 cysts/brain, i.e. an average of 4037 cysts/brain (positive control). In the mice of batch 2, 7 mice do not contain any brain cysts and one



mouse contains 30 brain cysts (i.e. a single cyst observed out of 16 counts of 10  $\mu$ l on a Malassez cell).

At D82

5

The naïve mice fed by gavage with the brains from the mice of batch 2 exhibit anti-MIC3 IgGs. The control mouse which received 60 cysts of the *Toxoplasma gondii* strain 76K derived from a mouse of batch 3 also  
10 exhibits anti-MIC3 IgGs.

At D103

The naïve mice fed by gavage with the brains from the mice of batch 2 exhibit, respectively, 500, 375, 1000, 250, 165, 125, 310 and 375 brain cysts. By way of comparison, the control mouse which received 60 cysts of the *Toxoplasma gondii* strain 76K exhibits 2250 brain  
15 cysts.

20

**Conclusion**

The mice immunized with the mic1-3KO mutant form virtually no brain cysts during a re-infection with the  
25 *Toxoplasma gondii* strain 76K (99.9% protection).

On the other hand, several of the brains of reinfected mice are infectious, orally, and therefore the immunization with the mic1-3KO vaccine strain is not  
30 completely sterilizing when there is a reinfection.

II- In sheep

**Experimental protocol**

35

On D0, 2 ewes were vaccinated subcutaneously with  $2 \times 10^6$  mic1-3KO mutant parasites. The vaccination

caused only a transient fever of 41°C (normal temperature = 39°C) at D2-3.

On D47, the ewes were entered into reproduction.

5

On D133, the vaccinated ewes were subjected to the challenge infection by administration, *per os*, of 400 oocysts, at 86 days of gestation. A control group consisting of 7 non-vaccinated ewes was subjected to the same challenge infection.

10

From D133, the ewes were placed under daily clinical observation.

## 15 Results

The 2 vaccinated ewes gave birth to a clinically healthy lamb on D196.

20 In the non-vaccinated control batch, the 7 ewes aborted, respectively at D141 (1), D143 (2), D145 (1), D153 (1), D173 (1) and D183 (1).

## III- Conclusion

25

Vaccination with the mic1-3KO mutant protects the animals against the formation of brain cysts during a possible re-infection. This protection reflects the ability of the vaccinated subject to considerably eliminate the scope of an infection with a natural strain and therefore to also limit, in the case of a gestating female, the transplacental passage which is the source of economic losses due to *Toxoplasma gondii*.

30

35 Moreover, the considerable decrease in the cystic load considerably minimizes the possibility of transmission by consumption of the meat from the vaccinated animals,

1st Filing

- 28 -

and therefore makes it possible, ultimately, to reduce the general prevalence of *Toxoplasma gondii* infection.

CLAIMS

1. A mutant strain of an Apicomplex of the family  
Sarcocystidae, characterized in that it comprises a  
5 mutation which inactivates the adhesin MIC1 and a  
mutation which inactivates the adhesin MIC3.

2. The mutant strain as claimed in claim 1,  
characterized in that it is a strain of toxoplasma.

10

3. The mutant strain as claimed in claim 2,  
characterized in that it is a strain of *Toxoplasma*  
*gondii*.

15 4. The use of a mutant strain as claimed in any one  
of claims 1 to 3, for obtaining a vaccine.

5. The use as claimed in claim 4, characterized in  
that said vaccine is an anti-toxoplasmosis vaccine.

20

6. A vaccine comprising a mutant strain as claimed in  
any one of claims 1 to 3.

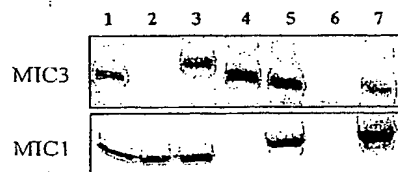


FIG. 1

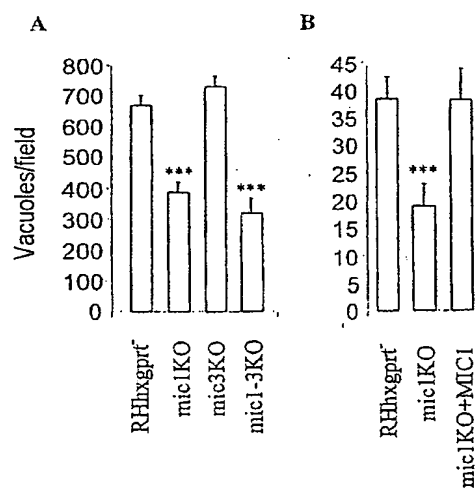


FIG. 2

1st Filing

2/3

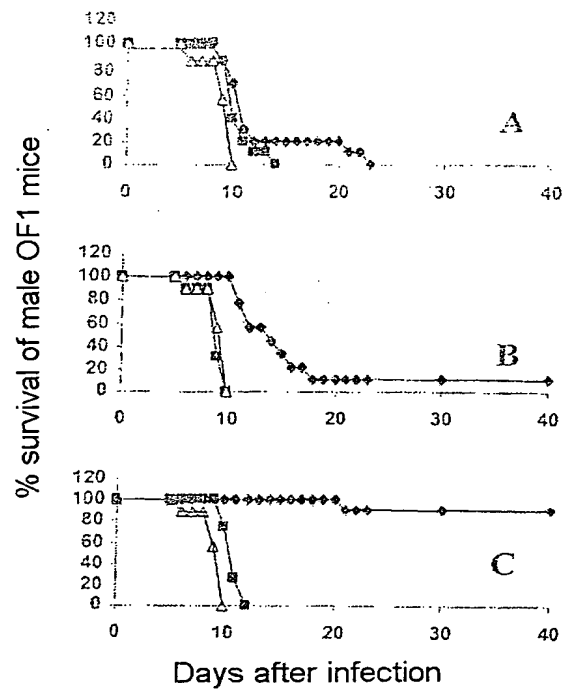


FIG. 3

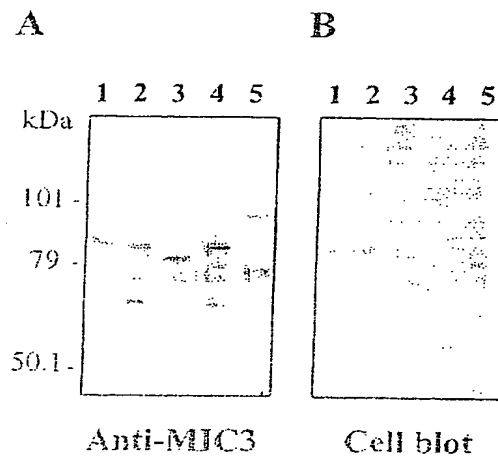


FIG. 4

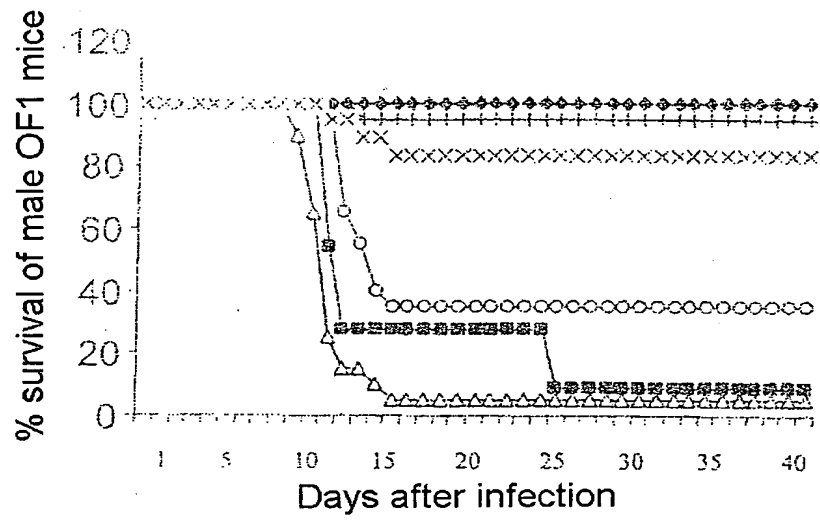


FIG. 5

## SEQUENCE LISTING

<110> Institut National de la Recherche Agronomique  
Centre National de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

<120> APICOMPLEX VACCINE STRAINS OF THE FAMILY SARCOCYSTIDAE

<130> MJPbv539/120

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR Primer: ML9

<400> 1

gtgtaagctt cagcgagtct ctgagag

27

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR Primer: ML10

<400> 2

ggggtagcga gctcatgagc agaagctgcc ag

32

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR Primer: ML23

<400> 3

ctgaattcag atcttaccag tgttggacaa gg

32

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR Primer: ML24



<400> 4  
ggggtacccc ttgctaggta accactcgtg c

31

<210> 5  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> PCR Primer: ML11

<400> 5  
gcacaattga gatctaaaat gcgaggcggg acgtcc

36

<210> 6  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> PCR Primer: ML15

<400> 6  
tgctatgcat tcctaggctg ctttaattttc tcacacgtca c

41

received on 13/02/04



# PATENT

## UTILITY CERTIFICATE

Intellectual Property Code - Book VI



N° 11235°03

### PATENTS DIVISION

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04 Fax: 33 (1) 42 94 86 54

DESIGNATION OF THE INVENTOR(S) Page No. ... 1 . / . 2  
(if the applicants are not the inventor or the inventors)

INV

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 113 @ W / 270601

Your file references (optional)		MJPbv539/120	
NATIONAL REGISTRATION No.			
TITLE OF THE INVENTION (200 characters or spaces maximum)			
APICOMPLEX VACCINE STRAINS OF THE FAMILY SARCOCYSTIDAE			
THE APPLICANT(S):			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - 75007 PARIS, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3 rue Michel Ange - 75016 PARIS, UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS - 3 rue des Tanneurs - 37041 TOURS CEDEX 1			
DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S):			
<b>1</b> Name		DUBREMETZ	
Forenames		Jean-François	
Address	Street	700 avenue Paul Parguel Résidence le Vivaldi, Appt 85, Bâtiment C1,	
	Postcode and town	3 4 0 9 0	MONTPELLIER
Employer company (optional)			
<b>2</b> Name		BOUT	
Forenames		Daniel	
Address	Street	41, rue du Maréchal Reille	
	Postcode and town	3 7 3 9 0	CERELLES
Employer company (optional)			
<b>3</b> Name		LEBRUN	
Forenames		Maryse	
Address	Street	15, rue Charles de Gaulle	
	Postcode and town	3 4 8 3 0	JACOU
Employer company (optional)			
If there are more than 3 inventors, use a number of forms. Indicate top right the page No. followed by the number of pages.			
DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE REPRESENTATIVE (Name and capacity of the signatory)			
VIALLE-PRESLES Marie José		[signature]	
(no. 93-2009)			

received on 13/02/04



# PATENT

## UTILITY CERTIFICATE

Intellectual Property Code - Book VI



N° 11235°03

### PATENTS DIVISION

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04 Fax: 33 (1) 42 94 86 54

DESIGNATION OF THE INVENTOR(S) Page No. . 2 . / . 2  
(if the applicants are not the inventor or the inventors)

INV

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 113 @ W / 270601

Your file references (optional)		MJPbv539/120	
NATIONAL REGISTRATION No.			
TITLE OF THE INVENTION (200 characters or spaces maximum)			
APICOMPLEX VACCINE STRAINS OF THE FAMILY SARCOCYSTIDAE.			
THE APPLICANT(S):			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - 75007 PARIS, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange - 75016 PARIS, UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS - 3, rue des Tanneurs - 37041 TOURS CEDEX 1			
DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S):			
<b>1</b> Name		SOËTE	
Forenames		Martine	
Address	Street	1 Place Courbet Apt 103	
	Postcode and town	6 2 0 0 0	ARRAS
Employer company (optional)			
<b>2</b> Name		CEREDE	
Forenames		Odile ...	
Address	Street	3, rue du Colonel Marchand	
	Postcode and town	3 4 0 0 0	MONTPELLIER
Employer company (optional)			
<b>3</b> Name			
Forenames			
Address	Street		
	Postcode and town		
Employer company (optional)			
If there are more than 3 inventors, use a number of forms. Indicate top right the page No. followed by the number of pages.			
DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE REPRESENTATIVE (Name and capacity of the signatory)			
VIALLE-PRESLES Marie José [signature] (no. 93-2009)			